

- (19)【発行国】日本国特許庁（JP）
 (12)【公報種別】公表特許公報（A）
 (11)【公表番号】特表2003-508729（P2003-508729A）
 (43)【公表日】平成15年3月4日（2003. 3. 4）
 (54)【発明の名称】核酸をベースとする検出
 (51)【国際特許分類第7版】

G01N 33/58	
C12N 15/09	ZNA
C12Q 1/68	
G01N 21/27	
21/64	
21/65	
21/78	
33/53	
33/533	
33/543	595
33/566	
33/569	

【FI】

G01N 33/58	A
C12Q 1/68	A
G01N 21/27	C
21/64	F
	G
21/65	
21/78	
33/53	L
33/533	
33/543	595
33/566	
33/569	B
C12N 15/09	ZNA A

【審査請求】未請求

【予備審査請求】有

【全頁数】72

- (21)【出願番号】特願2000-618716（P2000-618716）
 (86)(22)【出願日】平成12年5月12日（2000. 5. 12）
 (85)【翻訳文提出日】平成13年11月14日（2001. 11. 14）
 (86)【国際出願番号】PCT/US00/13183
 (87)【国際公開番号】WO00/070329
 (87)【国際公開日】平成12年11月23日（2000. 11. 23）
 (31)【優先権主張番号】60/134, 330

(32)【優先日】平成11年5月14日(1999. 5. 14)

(33)【優先権主張国】米国(US)

(31)【優先権主張番号】60/174, 398

(32)【優先日】平成12年1月5日(2000. 1. 5)

(33)【優先権主張国】米国(US)

(81)【指定国】EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71)【出願人】

【氏名又は名称】ブランディーズ・ユニバーシティ

【住所又は居所】アメリカ合衆国マサチューセッツ州02454-9110, ウォルサム, サウス・ストリート415

(72)【発明者】

【氏名】スタントン, マーティン

【住所又は居所】アメリカ合衆国マサチューセッツ州01775, ストウ, ハーヴァード・ロード64

(72)【発明者】

【氏名】ウェンシンク, ピーター

【住所又は居所】アメリカ合衆国マサチューセッツ州02181, ウェルズリー, コルバーン・ロード31

(72)【発明者】

【氏名】ステュワート, アレクサンダー

【住所又は居所】アメリカ合衆国マサチューセッツ州02154-2616, ウォルサム, アングルサ

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】社本 一夫（外5名）

【テーマコード（参考）】

2G043
2G045
2G054
2G059
4B024
4B063

【Fターム（参考）】

2G043 AA03 BA16 CA03 DA02 DA06 EA01 EA03 HA05 JA01 JA02 JA03 KA02 KA09 LA01 LA03
2G045 AA13 CA25 CA26 DA36 DA41 FA11 FA12 FB02 FB07 FB12 GC15
2G054 AA07 CA21 CA23 CE02 EA03 EA07 GA05 JA01
2G059 AA01 AA05 BB04 CC12 CC16 DD03 DD13 EE02 EE04 EE09 JJ12 KK04
4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 HA20
4B063 QA01 QA11 QR32 QR35

要約

(57)【要約】

本発明は、アプタマー・ビーコンを使用して、サンプル中の1又はそれを越える異なる化合物の存在及び量を同時に検出するための組成物、システム及び方法に関する。アプタマー・ビーコンは、タンパク質、ステロイド、又は無機分子のような非核酸標的分子に結合できる結合領域を有するオリゴヌクレオチドである。異なる標的分子に結合するように配置された結合領域を有するこれら新規なアプタマー・ビーコンは、溶液、固体、アレイをベースとする系で使用されることができる。これらアプタマー・ビーコンは、固体支持体、例えば、2次元アレイの予め決められた異なる諸点に付けられることができる。本発明は、この方法を実施するための装置、手段、及びコンピューターソフトウェアを包含する。

請求の範囲

【特許請求の範囲】

【請求項1】 非核酸標的分子に結合するアプタマー・ビーコンであって： ループ部分、第1セグメント、及び該第1セグメントに相補的な第2セグメントを含んでなるオリゴヌクレオチドであって、該第1及び第2セグメントが一緒にハイブリダイズしたときにステム部分を形成するオリゴヌクレオチド；
該オリゴヌクレオチドによって形成され、かつ該非核酸標的分子に結合するように配置された結合領

域；

該第1セグメントに付いている第1リポーター基；及び該第2セグメントに付いている第2リポーター基であって、それらの間の距離が変化したときに相互作用して検出可能な信号を発する第1及び第2リポーター基を含んでなるアプタマー・ビーコンであり；

該結合領域への該標的分子の結合が、該システム部分内の塩基対結合を破壊することで、該第1及び第2セグメントを離れさせるところの該アプタマー・ビーコンのコンフォメーションの変化を生じさせることにより、該第1及び第2リポーター基の間の距離を変化させて、検出可能な信号を発するアプタマー・ビーコン。

【請求項2】 該第1リポーター基が蛍光体であり、そして該第2リポーター基が化学消光体であり、それによって、該第1及び第2セグメントが一緒にハイブリダイズして該システム部分を形成したときに、該消光体が該蛍光体を消光させる、請求項1記載のアプタマー・ビーコンであって、該結合領域への標的分子の結合が、該システム部分内の塩基対結合を破壊することで、該第1及び第2セグメントを離れさせて該蛍光体を該化学消光体から離すことにより、該消光を終わらせて、該蛍光体が検出可能な蛍光を発するのを可能にするアプタマー・ビーコン。

【請求項3】 該結合領域が、該オリゴヌクレオチド内の該ループ部分内、該ステム部分内、又は少なくとも部分的に両方に位置している、請求項1記載のアプタマー・ビーコン。

【請求項4】 該第1及び第2リポーター基が酵素及び対応するリガンドである、請求項1記載のアプタマー・ビーコン。

【請求項5】 該第1及び第2セグメントが、各々、4、5、6又は7つのヌクレオチドを含んでなる、請求項1記載のアプタマー・ビーコン。

【請求項6】 該標的分子がトロンピンである、請求項1記載のアプタマー・ビーコン。

【請求項7】 非核酸標的分子に結合するアプタマー・ビーコンであって：第1セグメント、第2セグメント、及び該第1セグメントと該第2セグメントの間に位置する第3セグメントを含んでなるオリゴヌクレオチドであって、該アプタマー・ビーコンが該標的分子に結合していないときに、該第1及び第2セグメントが複合体を形成するオリゴヌクレオチド；

該標的分子と接触したときに該アプタマー・ビーコンによって形成される結合領域；

該第1セグメントに付いている第1リポーター基；及び該第2セグメントに付いている第2リポーター基であって、それらの間の距離が変化したときに相互作用して検出可能な信号を発する第1及び第2リポーター基を含んでなるアプタマー・ビーコンであり；

該結合領域への該標的分子の結合が、該複合体内の塩基対結合を破壊することで、該第1及び第2リポーター基の間の距離を変化させるところの該アプタマー・ビーコンのコンフォメーションの変化を生じさせて、検出可能な信号を発するアプタマー・ビーコン。

【請求項8】 該第1リポーター基がエネルギー吸収性基であり、該第2リポーター基が蛍光発光基であり、その結果、該第1及び第2リポーター基が十分に接近したときに、該エネルギー吸収性基がそれら基の間のエネルギー移動を可能にすることによって、該発光基が蛍光を発するのが可能になる、請求項7記載のアプタマー・ビーコンであって、該結合領域への標的分子の結合が、該第1及び第2セグメントと一緒にハイブリダイズさせるアプタマー・ビーコン。

【請求項9】 該結合領域が、完全に該オリゴヌクレオチドの該第3セグメント内に位置している、請求項7記載のアプタマー・ビーコン。

【請求項10】 該複合体が二重体である、請求項7記載のアプタマー・ビーコン。

【請求項11】 サンプル中の複数の異なる非核酸標的分子の存在を同時に検出するための装置であって： 固体支持体；及び 該支持体に結合した複数の異なるアプタマー・ビーコンであって、各々が該支持体に付いた第1末端と特定の非核酸標的分子に結合する結合領域とを有するアプタマー・ビーコンを含んでなり、異なるアプタマー・ビーコンの結合領域が異なる標的分子に結合する装置。

【請求項12】 該固体支持体が、該アプタマー・ビーコンの該第1末端がそれに共有結合したガラス表面を含んでなる、請求項11記載の装置。

【請求項13】 該固体支持体が、平坦表面を含んでなり、そして該アプタマー・ビーコンが該平坦表面上に2次元アレイで分布している、請求項11記載の装置。

【請求項14】 同一のアプタマー・ビーコンの諸スポットが、該2次元アレイにおいて異なる点に位置している、請求項13記載の装置。

【請求項15】 少なくとも1種のアプタマー・ビーコンの結合領域が、タンパク質、ステロイド、及び無機分子からなる群から選択される非核酸標的分子に結合するように配置されている、請求項11記載の装置。

【請求項16】 該アプタマー・ビーコンが、RNA、DNA、修飾RNA、修飾DNA、又はそれらの組合せを含んでなる、請求項11記載の装置。

【請求項17】 各々のアプタマー・ビーコンが、該結合領域への標的分子の結合の信号を発するためのリポーター基を含んでなる、請求項11記載の装置。

【請求項18】 該リポーター基が蛍光体を含んでなる、請求項17記載の装置。

【請求項 1 9】 サンプル中の 1 又はそれを越える異なる標的分子の存在又は不存在を検出する方法であって： 請求項 1 の複数のアプタマー・ビーコンを得ること；

該サンプル中のあらゆる標的分子が該アプタマー・ビーコンの対応する結合領域に結合できるように、該サンプルを該アプタマー・ビーコンに接触させること；及び 該アプタマー・ビーコンに結合した標的分子の存在を検出ことを含んでなる方法。

【請求項 2 0】 該アプタマー・ビーコンが液体中にある、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】 該アプタマー・ビーコンが固体支持体に結合している、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 2】 該固体支持体が粒子である、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 3】 該固体支持体がプレートである、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 4】 該アプタマー・ビーコンが、極微波によって励起されたときに蛍光線を発する、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 5】 各々が複数の同一のアプタマー・ビーコンを含んでなる異なる諸スポットが該固体支持体上の予め決められたアレイ内に分布しており、かつ、該サンプルの蛍光パターンを既知蛍光パターンと比較することを更に含んでなる、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 6】 該比較段階が、コンピューター読み取り可能な媒体で処理されるコンピュータープログラムの使用を包含し、該コンピュータープログラムが、プロセッサに： 該サンプルの蛍光パターンを既知蛍光パターンのライブラリーと比較させ；そして 該サンプルの該蛍光パターンと最もよく合致する既知蛍光パターンの組合せを選択させるための指示内容を含んでいる、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】 該検出段階が、アプタマー・ビーコンのラマン発光周波数の変化を検出することを包含し、該変化が該アプタマー・ビーコンへの標的分子の結合によって起こされる、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 8】 該固体支持体が、該アプタマー・ビーコンがそれに結合する金属膜を含んでなり、該検出段階が、アプタマー・ビーコンへの標的分子の結合によって起こされる該金属膜中の表面プラズモンの共鳴条件の変化を検出することを包含する、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 9】 サンプルの組成を決定して、既知の異常状態の存在又は不存在を推定するアッセイのアウトプットを分析するための、コンピューター読み取り可能な媒体で処理されるコンピュータープログラムであって、プロセッサに： 該アッセイアウトプットを、既知組成のサンプルを該アッセイに付した場合に対応する既知アウトプットのライブラリーと比較させ；

該アッセイアウトプットと最もよく合致する既知アウトプットの組合せを選択させ；

該サンプルアウトプットと該既知アウトプットの組合せとの間の偏差を、既知の異常状態によって生じる既知の偏差のライブラリーと比較させ；そして 既知の異常状態の存在又は不存在を推定させるための指示内容を含んでいるコンピュータープログラム。

【請求項 3 0】 該既知の異常状態が、該サンプル中の異常化合物の存在、及び異常な量での正常化合物の存在を包含する、請求項 2 9 記載のコンピュータープログラム。

【請求項 3 1】 該アッセイアウトプット及び既知アウトプットが像を含んでなる、請求項 2 9 記載のコンピュータープログラム。

【請求項 3 2】 サンプルの組成を決定して、既知の異常状態の存在又は不存在を推定するアッセイのアウトプットを分析する方法であって： 該アッセイアウトプットを、既知組成のサンプルを該アッセイに付した場合に対応する既知アウトプットのライブラリーと比較し；

該アッセイアウトプットと最もよく合致する既知アウトプットの組合せを選択し；

該サンプルアウトプットと該既知アウトプットの組合せとの間の偏差を、既知の異常状態によって生じる既知の偏差のライブラリーと比較し；そして 既知の異常状態の存在又は不存在を推定することを含んでなる方法。

【請求項 3 3】 サンプル中の標的分子の存在を検出するための装置であって： 固体支持体；及び 該支持体に結合した複数の異なるアプタマー・ビーコンであって、各々が該支持体に付いた第 1 末端と、該標的分子の特定のエナンチオマー又は該標的分子の特定の結合部位に結合する結合領域とを有するアプタマー・ビーコンを含んでなり、異なるアプタマー・ビーコンの該結合領域が、該標的分子の異なるエナンチオマーに又は該標的分子の異なる結合部位に結合する装置。

【請求項 3 4】 該標的が抗原を含んでなり、そして該異なる結合部位が該抗原の異なるエピトープを含んでなる、請求項 3 3 記載の装置。

【請求項 3 5】 該標的が細菌を含んでなり、そして該異なる結合部位が該細菌の異なる表面タンパク質を含んでなる、請求項 3 3 記載の装置。

【請求項 3 6】 サンプル中の複数の異なる非核酸標的分子の存在を同時に検出するためのシステムであって： 複数の異なる請求項 1 のアプタマー・ビーコンであって、各々が、該支持体に付いた第 1 末端、特定の非核酸標的分子に結合する結合領域、異なる標的分子に結合する異なるアプタマー・ビーコンの結合領域を有するアプタマー・ビーコン；及び アプタマー・ビーコンに結合した標的分子の存在を検出する、照射源と検出器を含んでなる検出系を含んでなるシステム。

【請求項 3 7】 照射源がレーザーを含んでなる、請求項 3 6 記載のシステム。

【請求項 3 8】 該検出器のアウトプットに基づいて該サンプル中の標的分子の存在を確認するためのアナライザーを更に含んでなる請求項 3 6 記載のシステムであって、該アナライザーが： 該検出器のアウトプットを、既知組成のサンプルを該アプタマー・ビーコンに曝した場合に対応する既知アウトプットのライブラリーと比較させ；そして 該アッセイアウトプットと最もよく合致する既知アウトプットの組合せを選択させるようにプログラムされたコンピュータプロセッサを含んでなるシステム。

【請求項 3 9】 該アプタマー・ビーコンが液体中にある、請求項 3 6 記載のシステム。

【請求項 4 0】 該アプタマー・ビーコンが固体支持体に付いている、請求項 3 6 記載のシステム。

【請求項 4 1】 該オリゴヌクレオチドが、RNA 又は修飾 RNA を含んでなる、請求項 1 記載のアプタマー・ビーコン。

【請求項 4 2】 該オリゴヌクレオチドが、DNA 又は修飾 DNA を含んでなる、請求項 1 記載のアプタマー・ビーコン。

【請求項 4 3】 サンプル中の複数の異なる非核酸標的分子の存在を同時に検出するためのシステムであって： 複数の異なる種の請求項 1 のアプタマー・ビーコンであって、各々の種が、異なるリポーター基、特定の非核酸標的分子に結合する結合領域を有し、該異なるアプタマー・ビーコンの結合領域が、異なる標的分子に結合する、アプタマー・ビーコン；及び アプタマー・ビーコンに結合した標的分子の存在を検出する、該異なるリポーター基を検出できる検出系を含んでなるシステム。

詳細な説明

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

本発明は、核酸を用いて分子種を検出するための組成物、システム及び方法に関する。

【0002】

【発明の背景】

種々のタイプのシステムが、複雑なサンプル中の特定の化学種又は分子の存在を検出するために用いられてきた。例えば、抗体は、サンプル中のタンパク質の存在を検出するために用いられ、そして DNA マイクロアレイチップは、遺伝子を同定するため及び遺伝子発現を研究するために用いられてきた。殆

どの現行の分子検出システムは、単一タイプ又は単一カテゴリーの標的分子の存在を検出するよう設計されている。抗体検出の場合、典型的には、現行のシステムは、下位のタイプの分子だけの検出に限られている。

【0003】

最近、RNA及びDNAアプタマーが、種々の用途において、モノクローナル抗体と置き換えられることが分かってきた (Jayasena, "Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics." Clin. Chem., 45(9):1628-50, 1999; Morris et al., "High affinity ligands from in vitro selection: complex targets." Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95(6):2902-7, 1998)。特定のアプタマーの比較的迅速な選択プロセス及び高価でない合成のために、アプタマーは、モノクローナル抗体の有用な代替物となっている。これら核酸は、容易に合成され、容易に手を加えられ、そして長期にわたって保存されることができる。これら恩恵のために、核酸は、それらの対応タンパク質や抗体よりも魅力的なバイオテクノロジーツールになっている。更に、これら核酸プローブは、放射性同位元素、ビオチン、又は蛍光標識によって標識されることもできるので、種々の条件下で標的を検出するのに用いられることができる。それらの非核酸標的を認識するDNA及びRNAアプタマーの多くの数がSELECTによって開発され、そして特徴付けされてきた (Gold et al., "Diversity of Oligonucleotide Functions," Annu. Rev. Biochem., 64:763-97, 1995; Bacher & Ellington, "Nucleic Acid Selection as a Tool for Drug Discovery," Drug Discovery Today, 3(6):265-273, 1998)。

【0004】

【発明の要旨】

本発明は、新規な核酸センサー分子を使用して、サンプル中の1又はそれを越える異なる化合物の存在及び量を同時に検出するための新規な組成物、システム及び方法に関する。核酸は、これまでに、タンパク質、小さな有機分子、又は無機分子のような非核酸標的分子に高い親和性で特異的に結合できることが示されてきた。これら核酸は、広くアプタマーと言われている。アプタマーは、天然に存在するヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドから構成されるRNA又はDNAのいずれであってもよい。

これら新規な組成物では、標準的なアプタマーは、標的分子へのそのアプタマーの結合性が、アプタマーのコンフォメーションの変化を生じさせるように、生物工学処理されている。更には、1又はそれを越えるリポーター基が、その生物工学処理されたアプタマー内に含まれて、その生物工学処理されたアプタマーのコンフォメーションの変化が、そのリポーター基 (又は生物工学処理されたアプタマー自体) の物性を検出可能にするようにされている。これら生物工学処理されたアプタマーを、本明細書

では、アプタマー・ビーコン (aptamer beacon) と呼ぶ。

【0005】

異なる標的分子に結合するように配置された結合領域を有するアプタマー・ビーコンは、種々の検出法又は検出システムに使用することができる。例えば、これら新規なアプタマー・ビーコンは、溶液をベースとするアッセイに使用されても、固体をベースとするアッセイでの使用のために固体支持体に、例えば、1次又は2次元アレイ内で予め決められた点に取り付けられてもよい。次いで、それらアプタマー・ビーコン又はアプタマー・ビーコンアレイは、サンプルに曝されて、そのサンプル中の標的分子が、それらそれぞれのアプタマー・ビーコンに結合する。結合した標的分子の存在は、そのアプタマー・ビーコンリポーター基の物性の変化を測定することにより、例えば、そのアプタマー・ビーコンの蛍光効力の変化を観察することにより、検出されることができる。

【0006】

サンプルの分析を支援するために、この新規な検出系は、パターン認識ソフトウェアを包含することができる。そのソフトウェアは、未知サンプルに対応する標的分子結合パターンを既知化合物に対応する結合パターンと比較するものである。これら比較から、そのソフトウェアは、そのサンプルの組成を決定することも、そのサンプルの供給源についての情報を推定することもできる。

それらシステムは、一定の化学種若しくは状態に関連する特性化合物又は“分子指紋”の存在を検出するのに使用されることができる。例えば、それらシステムは、特定の薬物の代謝産物の存在を検出することによって、ヒトの薬物試験に使用されることができる。それらシステムは、疾患状態に関連する化合物の存在を検出することによって、疾患（例えば、癌）の存在を推定するためにも、一定の汚染物を放出する特性の化合物を検出することによって、汚染モニターにも使用されることができる。数多くの他の用途も可能である。

【0007】

一般的には、本発明は、非核酸標的分子に結合するアプタマー・ビーコンであって：ループ部分、第1セグメント、及び該第1セグメントに相補的な第2セグメントを含むオリゴヌクレオチドであって、該第1及び第2セグメントが一緒にハイブリダイズしたときにステム部分を形成するオリゴヌクレオチド；該オリゴヌクレオチドによって形成され、かつ該非核酸標的分子に結合するように配置された結合領域；該第1セグメントに付いている第1リポーター基、例えば、蛍光体、及び該第2セグメントに付いている第2リポーター基、例えば、化学消光体であって、それらの間の距離が変化したときに相互作用して検出可能な信号を発する第1及び第2リポーター基；を含んでなるアプタマー・ビーコンであ

り；該結合領域への該標的分子の結合が、該ステム部分内の塩基対結合を破壊することで、該第1及び第2セグメントを離れさせるところの該アプタマー・ビーコンのコンフォメーションの変化を生じさせることにより、該第1及び第2リポーター基の間の距離を変化させて、検出可能な信号を発する、アプタマー・ビーコンにその特徴がある。

【0008】

アプタマー・ビーコンにおけるコンフォメーション変化は、そのアプタマー・ビーコンを作り上げるオリゴヌクレオチドの第2及び／又は第3構造における変化である。コンフォメーション変化は、典型的には、アプタマー・ビーコンの互変形態間における塩基対合相互作用の追加及び／又は削除をもたらす。

これら新規なアプタマー・ビーコンでは、第1リポーター基が蛍光体でありかつ第2リポーター基が化学消光体であるとき、第1及び第2セグメントと一緒にハイブリダイズしてステム部分を形成したときにその消光体はその蛍光体を消光させる。その際、結合領域への標的分子の結合が、そのステム部分内の塩基対結合を破壊することで、それら第1及び第2セグメントを離れさせて、その蛍光体をその化学消光体から離すことにより、その消光を終わらせて、その蛍光体が検出可能な蛍光を発するのを可能にする。

これらアプタマー・ビーコンでは、結合領域は、完全に又は部分的に、ループ部分内に位置しても、ステム部分内に位置しても、少なくとも部分的にその両方内に位置してもよい。加えて、第1及び第2リポーター基は、酵素と対応するリガンドであることができ、そして第1及び第2セグメントは、各々、4、5、6又は7つのヌクレオチドを含むことができる。

【0009】

本発明は、非核酸標的分子に結合するアプタマー・ビーコンであって：第1セグメント、第2セグメント、及び該第1セグメントと該第2セグメントの間に位置する第3セグメントを含むオリゴヌクレオチドであって、該アプタマー・ビーコンが該標的分子に結合していないときに該第1及び第2セグメントが、複合体、例えば、ハイブリッド二重体又は他の第2若しくは第3構造を形成するオリゴヌクレオチド；該標的分子と接触したときに該アプタマー・ビーコンによって形成される結合領域；該第1セグメントに付いている第1リポーター基、及び該第2セグメントに付いている第2リポーター基であって、それらの間の距離が変化したときに相互作用して検出可能な信号を発する第1及び第2リポーター基；を含むアプタマー・ビーコンであり；該結合領域への該標的分子の結合が、該複合体内の塩基対結合を破壊することで、該第1及び第2リポーター基の間の距離を変化させるところの該アプタマー・ビーコン

のコンフォメーションの変化を生じさせて、検出可能な信号を発する、アプタマー・ビーコンにも特徴がある。

【0010】

これらアプタマー・ビーコンでは、第1リポーター基がエネルギー吸収性基であり、かつ第2リポーター基が蛍光発光基であることができ、その結果、第1及び第2リポーター基が十分に接近したときに、そのエネルギー吸収性基がそれら基の間のエネルギー移動を可能にすることによって、その発光基が蛍光を発するのが可能になる。その際、結合領域への標的分子の結合が、第1及び第2セグメントと一緒にハイブリダイズさせる。

【0011】

別の側面では、本発明は、サンプル中の複数の異なる非核酸標的分子の存在を同時に検出するための装置に特徴がある。この装置は、固体支持体；及びその支持体に結合した複数の異なるアプタマー・ビーコンであって、各々がその支持体に付いた第1末端と特定の非核酸標的分子に結合する結合領域とを有するアプタマー・ビーコンを含み、その装置では、異なるアプタマー・ビーコンの結合領域が異なる標的分子に結合する。これら装置では、その固体支持体は、それらアプタマー・ビーコンの第1末端がそれに共有結合したガラス表面であることができる。加えて、その固体支持体は、平坦表面を有し、そしてそれらアプタマー・ビーコンは、その平坦表面上に2次元アレイで分布していてもよい。

この装置内の少なくとも1種のアプタマー・ビーコンの結合領域は、タンパク質、ステロイド、及び無機分子からなる群から選択される非核酸標的分子に結合するように配置されることができる。それらアプタマー・ビーコンは、RNA、DNA、修飾RNA、修飾DNA、又はそれらの組合せを含んでなることができる。加えて、各々のアプタマー・ビーコンは、結合領域への標的分子の結合の信号を発するための、蛍光体のようなリポーター基を含んでなることができる。

【0012】

本発明は、サンプル中の1又はそれを越える異なる標的分子の存在又は不存在を検出する方法であって、複数の新規なアプタマー・ビーコンを得ること；該サンプル中のあらゆる標的分子が該アプタマー・ビーコンの対応する結合領域に結合できるように、該サンプルを該アプタマー・ビーコンに接触させること；及び該アプタマー・ビーコンに結合した標的分子の存在を検出ことによる方法にも特徴がある。それらアプタマー・ビーコンは液体中であっても、粒子又はプレートのような固体支持体に結合されていてもよい。ある態様では、これらアプタマー・ビーコンは、極微波によって励起されたときに

蛍光線を発する。

この方法では、各々が複数の同一のアプタマー・ビーコンを含む異なる諸スポットが固体支持体上の予め決められたアレイ内に分布していてもよく、そして、この方法は、サンプルの蛍光パターンを既知蛍光パターンと比較することを更に含むことができ、例えば、コンピューター読み取り可能な媒体で処理されるコンピュータープログラムであって、そのサンプルの蛍光パターンを既知蛍光パターンのライブラリーと比較し；そしてそのサンプルの蛍光パターンと最もよく合致する既知蛍光パターンの組合せを選択することをプロセッサにさせるための指示内容を含んでいるコンピュータープログラムで比較することを更に含むことができる。

この検出段階は、標的分子がアプタマー・ビーコンに結合したときに生じるアプタマー・ビーコンのラマン発光周波数の変化を検出することを含むこともできる。

【0013】

別の側面では、本発明は、サンプルの組成を決定して、既知の異常状態の存在又は不存在を推定するアッセイのアウトプットを分析するための、コンピューター読み取り可能な媒体で処理されるコンピュータープログラムであって、プロセッサに：該アッセイアウトプット、例えば、像を、既知組成のサンプルを該アッセイに付した場合に対応する既知アウトプットのライブラリーと比較させ；該アッセイアウトプットと最もよく合致する既知アウトプットの組合せを選択させ；該サンプルアウトプットと該既知アウトプットの組合せとの間の偏差を、既知の異常状態によって生じる既知の偏差のライブラリーと比較させ；そして既知の異常状態の存在又は不存在を推定させるための指示内容を含んでいるコンピュータープログラムに特徴がある。

【0014】

本発明は、サンプルの組成を決定して、既知の異常状態の存在又は不存在を推定するアッセイのアウトプットを分析する方法であって、該アッセイアウトプットを、既知組成のサンプルを該アッセイに付した場合に対応する既知アウトプットのライブラリーと比較し；該アッセイアウトプットと最もよく合致する既知アウトプットの組合せを選択し；該サンプルアウトプットと該既知アウトプットの組合せとの間の偏差を、既知の異常状態によって生じる既知の偏差のライブラリーと比較し；そして既知の異常状態の存在又は不存在を推定することによる方法にも特徴がある。

別の側面においては、本発明は、サンプル中の標的分子の存在を検出するための装置に特徴がある。この装置は、固体支持体；及び該支持体に結合した複数の異なるアプタマー・ビーコンであって、各々が該支持体に付いた第1末端と、該標的分子のエナンチオマーに結合する結合領域とを有するアプタ

マー・ビーコンを含み、異なるアプタマー・ビーコンの結合領域が異なる標的分子のエナンチオマーに結合する。

【0015】

更には、本発明は、サンプル中の標的の存在を検出する装置を包含する。この装置は、固体支持体；及び該支持体に結合した複数の異なるアプタマー・ビーコンであって、各々が該支持体に付いた第1末端と、該標的の特定の結合部位に結合する結合領域とを有するアプタマー・ビーコンを含み、異なるアプタマー・ビーコンの該結合領域が、異なる結合部位に結合する。例えば、標的が抗原であって、異なる結合部位がその抗原の異なるエピトープであることも、標的が細菌であって、異なる結合部位がその細菌の異なる表面タンパク質であることもできる。

【0016】

本発明は、更に、サンプル中の複数の異なる非核酸標的分子の存在を同時に検出するためのシステムに特徴がある。そのシステムは、固体支持体（任意要素）；該支持体がある場合にはそれに結合していてもよい複数の異なるアプタマー・ビーコンであって、各々が、該支持体に付いた第1末端、特定の非核酸標的分子に結合する結合領域、異なる標的分子に結合する異なるアプタマー・ビーコンの結合領域を有するアプタマー・ビーコン；及び、アプタマー・ビーコンに結合した標的分子の存在を検出する、照射源、例えば、レーザー、と検出器とを含む検出系を含む。このシステムは、更に、その検出系のアウトプットに基づいてサンプル中の標的分子の存在を確認するためのアナライザーを含むことができる。このアナライザーは、その検出系のアウトプットを、既知組成のサンプルを支持体上のアプタマー・ビーコンに曝した場合に対応する既知アウトプットのライブラリーと比較し；そして、それらアッセイアウトプットと最もよく合致する既知アウトプットの組合せを選択するようにプログラムされたコンピュータプロセッサを含むこともできる。そのコンピュータプロセッサは、更に、その検出系のアウトプットと既知アウトプットの組合せとの間の偏差を、既知の異常状態によって生じる既知の偏差のライブラリーと比較し；そして既知の異常状態の存在又は不存在を推定するようプログラムされることができる。

【0017】

更なる別の側面においては、本発明は、サンプル中の1又はそれを越える異なる標的分子の存在又は不存在を、複数の異なる種のアプタマー・ビーコンを用いて、同時に検出するための方法又はシステムであって：アプタマー・ビーコンの各々の種が、異なるリポーター基、特定の非核酸標的分子に結合する結合領域を有し、それら異なるアプタマー・ビーコンの結合領域が、異なる標的分子に結合する、アプ

アプタマー・ビーコン；及びアプタマー・ビーコンに結合した標的分子の存在を検出する、それら異なるリポーター基を検出できる検出系を含む。この方法は、複数の同一のアプタマー・ビーコンで実施されることもできる。例えば、各々のアプタマー・ビーコンが、標的結合で蛍光特性を変化させる分子ビーコンのようなりポーターを含んでもよい。アプタマー・ビーコンの各々の種は、複数の標的分子を同時に検出できるように、異なる蛍光染料で標識されることができる。例えば、1つの種がフルオレセインで標識され、別の種がローダミンで標識されるかも知れない。蛍光励起波長（又はスペクトル）は変動してもよく、及び／又は発光スペクトルが複数の標的の存在を同時に検出するように観察されてもよい。

【0018】

蛍光測定は、標準的な蛍光分光光度計を含む多くの異なる計測器で行なわれても、レーザーのような高強度光源、高開口数顕微鏡対物レンズのような高効率集光光学素子、及び光電子増倍管、フォトダイオード又はCCDカメラのような高効率低ノイズ検出器を用いる小容量体で行なわれてもよい。

この方法は、更に、プロセッサに、測定された蛍光発光又は励起スペクトルを各々の個別染料の既知スペクトルと比較させて、溶液中の各々の標的分子の濃度を定量的に決定させる指示内容を含むコンピュータプログラムを含むことができる。

本発明の異なる側面は、次の1又はそれを越える利点を含むことができる。アプタマー・ビーコンをベースとする検出系は、複数の異なる化合物の同時検出又は複数の異なるやり方での単一標的高感度検出を可能にする。生物内で選択される抗体とちがって、本アプタマーは、*in vitro*で、例えば、試験管内で選択されることができる。これは、毒性の又は免疫学的に不活性である標的分子の検出を可能にする。標準的なアプタマーとちがって、この新規なアプタマー・ビーコンは、アプタマー：標的結合相互作用をそのアプタマー・ビーコンの検出可能な物性変化に変換する。

【0019】

更には、本検出系におけるアプタマー・ビーコンは、それらの標的分子について高い親和性を有するので、超高感度検出が可能になる。結果として、本システムは高度に特異性となるので、僅か一個のメチル基又はヒドロキシル基だけが相違する分子を区別することができる。

本システムは、サンプルの迅速な分析（数分の速さ）も可能にするので、不安定な化合物の検出が容易になる。加えて、本アッセイで使用される試薬は高価ではないので、このアッセイの実施に関与する化学事象が容易に自動化される。

本検出系は、薬物試験、細菌又は抗原の存在についての高感度試験、汚染モニター、及び疾患の存在又は不存在の試験を包含する種々の用途に使用できる。

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び専門用語は、この発明が属する分野の当業者によって共通に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載されるのと類似の又は等価の方法及び材料が、本発明の実施又は試験に使用されることができ、以下では、適する方法及び材料を説明する。本明細書で挙げられる全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の文献は、それら全体が参照により本明細書中に組み入れられる。衝突がある場合には、定義を含めて、本明細書が優先する。加えて、材料、方法及び実施例は、例示のためだけであって、限定を意図するものではない。本発明の他の特徴及び効果が、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかになろう。

【0020】

【詳細な説明】

アプタマー・ビーコンは、アプタマー・ビーコン：標的の相互作用でコンフォメーションの変化、即ち、検出可能になる物性変化を受けるように生物工学処理された核酸である。これらアプタマー・ビーコンは、周知のアプタマー選択技術を使用して選択されたアプタマーから生物工学処理されることができる。アプタマー・ビーコンは、溶液をベースとする検出系でも、固体、例えば、アレイをベースとする検出系のいずれでも用いられることができる。

アプタマー・ビーコンをベースとする溶液検出系には、特定の標的分子及び検出系に結合するように配置されたアプタマー・ビーコンが含まれる。この検出系は、アプタマー・ビーコンの1又はそれを越える物性の変化、例えば、蛍光効力の変化をモニターすることによって、標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合を検出する。

【0021】

アプタマー・ビーコンアレイをベースとする系は、特定の標的分子、支持体、及び検出系に結合するように配置されたアプタマー・ビーコンを包含する。これら系では、アプタマー・ビーコンは、例えば、1又は2次元アレイで支持体に付いている。この検出系は、蛍光リポーター基の蛍光効力の変化、ラマン発光の変化、又は表面プラズモン共鳴を引き起こすのに要求される条件のシフトのような、アプタマー・ビーコンの1又はそれを越える物性の変化をモニターすることによって、標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合を検出する。

パターン認識及び分析ソフトウェアが、その検出系のアウトプットを既知化合物又はサンプルによって生ずるアウトプットと比較するために使用されることができる。これら比較から、そのソフトウェアは、例えば、そのサンプルの組成やそのサンプル源の状態についての情報を決定することができる。

【0022】

アプタマー選択 特定の標的分子に結合するように配置されたアプタマーが、例えば、オリゴヌクレオチドの初期異種集団を合成してから、特定の標的分子に強く結合する集団内のオリゴヌクレオチドを選択することにより、選択されることができる。特定の標的分子に結合するアプタマーが同定されたら、それは、生物学及び他の技術分野で公知の種々の技術を使用して、例えば、クローニング及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅をしてから転写することによって、複製されることができる。

オリゴヌクレオチドの異種集団の合成及びその集団内のアプタマーの選択は、Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment 又は SELEX として知られている操作を使用して達成されることができる。この SELEX 法は、例えば、Gold et al の米国特許第 5, 270, 163 号及び 5, 567, 588 号；Fitzwater et al., "A SELEX Primer," *Methods in Enzymology*, 267:275-301 (1996); 及び Ellington and Szostak, "In Vitro Selection of RNA Molecules that Bind Specific Ligands," *Nature*, 346:818-22 に記載されている。簡単に説明すると、異種 DNA オリゴマー集団が合成されて、アプタマーの In vitro 選択のための候補オリゴマーが提供される。この初期 DNA オリゴマー集団は、長さ 10 ～ 50 ヌクレオチドの固定された 5' 及び 3' 配列が側面に位置する長さ 15 ～ 100 ヌクレオチドのランダム配列の組である。この固定された領域は、PCR プライマーハイブリダイゼーションのための部位を提供し、そして一つの手段では RNA オリゴマーの集団を生成させるための RNA ポリメラーゼによる転写の開始のための部位を提供する。この固定された領域は、選択されたアプタマーをクローニングするための制限部位も含有する。多くの例の固定された領域をアプタマー発生のために使用することができる。例えば、Conrad et al., "In Vitro Selection of Nucleic Acid Aptamers That Bind Proteins," *Methods in Enzymology*, 267:336-83 (1996); Ciesiolka et al., "Affinity Selection-Amplification from Randomized Ribooligonucleotide Pools," *Methods in Enzymology*, 267:315-35 (1996); Fitzwater(前出)を参照のこと。

【0023】

アプタマーは、5 ～ 100 サイクルの操作で選択される。各サイクルで、オリゴマーは、標的分子に結合され、それらが結合した標的を単離することにより精製され、標的から放たれ、そして 20 ～ 30 世代の PCR 増幅により複製される。

アプタマー選択は、生物学における機能の発生的選択に類似する。異種オリゴマー集団を上記のアプタマー選択操作に付することは、連続的に再産生される生物学的集団を、機能についての 10 ～ 20 の厳格な選択であって、各選択が 20 ～ 30 世代の複製によって分離される選択に付するのに似ている。

異種性は、例えば、アプタマー選択操作の開始時にだけ導入され、全体の複製プロセスを通して起こることはない。また、異種性は、アプタマー選択操作の後半段階に導入されてもよい。

【0024】

例えば、2'-フルオロリボヌクレオチドオリゴマー、NH₂-置換及びOCH₃-置換リボースアプタマー、及びデオキシリボースアプタマーを包含する種々のオリゴマーが、アプタマー選択に使用されることができる。RNA及びDNA集団は、等しく、あらゆるタイプの標的分子に結合するように配置されるアプタマーを提供することができる。いずれの集団内でも選択されるアプタマーは、10⁹～10¹³の頻度で存在する。Gold et al., "Diversity of Oligonucleotide Functions," Annual Review of Biochemistry, 64:763-97 (1995)を参照のこと。そして、最も頻繁には、抗原に結合する抗体の親和性とほぼ強い親和性である、標的へのナノモル結合親和性を有する。Griffiths et al., EMBO j., 13:3245-60 (1994)を参照のこと。

【0025】

2'-フルオロリボヌクレオチドオリゴマーを使用することは、結合親和性を未置換のリボ又はデオキシリボオリゴヌクレオチドで得られるものの10～100倍に高めるようである。Pagratis et al., "Potent 2'-amino and 2' fluoro 2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor" Nature Biotechnology, 15:68-73を参照のこと。そのような修飾された塩基は、追加の結合相互作用を提供してアプタマーの第2構造の安定性を高める。これら修飾は、そのアプタマーをヌクレアーゼに抵抗性にもするので、このシステムの現実の世界的応用にとって大きな利益がある。Lin et al., "Modified RNA sequence pools for in vitro selection" Nucleic Acids Research, 22:5229-34 (1994); Pagratis(前出)を参照のこと。

【0026】

アプタマー・ビーコンの生物工学 アプタマーが選択されたら、それらは、アプタマー・ビーコンを形成するために更に生物工学処理される。それらアプタマーは、それらアプタマーが、結合性コンフォメーションに加えて、互変性の第2及び／又は第3非結合性コンフォメーションを形成できるように、それらアプタマーの1次配列を修飾することによって変性される。アプタマーは、通常、結合を容易にする活性な第2及び第3構造に折り畳まれていて、典型的には、この結合性コンフォメーションのままである。アプタマー・ビーコンを形成するためにそれらアプタマーのヌクレオチド配列を変化させるか又は付加を行なうことによって、標的分子の不存在下でエネルギー的に有利な互変性の非結合性コンフォメーションが確立される。標的分子の存在下では、アプタマー・ビーコンの結合性コンフォメーション

が非結合性コンフォメーションより有利である。換言すると、これら追加のヌクレオチドは、そのアプタマー・ビーコンが標的分子と接触して結合したときに1つの安定で有利な結合性コンフォメーションを有するのを可能にし、そして、標的の不存在下では、結合性コンフォメーションを形成しない1又はそれを越える非結合性コンフォメーションを有するのを可能にする。再び述べると、アプタマー・ビーコンは、2又はそれを越える状態で存在することができ、標的分子は、これら2つの状態間の分子スイッチとして働く。加えて、非結合性コンフォメーションは、そのアプタマー・ビーコンが標的に結合するのを阻止するほど安定であってはならない。しかし、アプタマー・ビーコンが標的に結合すると、好ましくは、結合性コンフォメーションが最も有利となる。

【0027】

染料、酵素、又は他の試薬、又はコンフォメーション変化に感受性の試薬のペアを包含するリポーター基又はリポーター部分も、アプタマー・ビーコンを形成するために、生物工学処理されるアプタマー内に組み込まれる。リポーター基は、転写前でも転写後でもアプタマー・ビーコン内に組み込まれることができ、潜在的には、既知アプタマー内にも、望まれるアプタマーがそこから選択されるオリゴヌクレオチドのプール内に導入されることができる。

アプタマー・ビーコンが標的分子に結合すると、リポーター基は活性化されて随伴性信号を発する（例えば、蛍光染料の場合には、蛍光強度、異方性、波長又はFRETの変化）。

伝統的な方法、例えば、SELEXを使用して選択されたアプタマーは、典型的には、既知の最少核酸配列を有し、そしてしばしば既知の結合部位を有する。これらアプタマーは、そのアプタマーの二重体領域に相補的である、理想的には標的分子に結合するアプタマーの領域、即ち、アプタマー結合領域に相補的である、例えば、3、4、5、6又は7つのヌクレオチドを典型的に含有するオリゴヌクレオチド配列を付加させることによって工学的に作られる。相補的オリゴヌクレオチドがハイブリダイズすべき好ましいアプタマー領域は、M-FOLDTMのような第2構造予測ソフトウェアを使用して決定れることができる。

【0028】

これらソフトウェアプログラムは、異なる仮想的アプタマー・ビーコンを比較するのににも使用されることができる。好ましい態様においては、アプタマー・ビーコンの互変性未結合形態について予測される自由エネルギーは、結合したコンフォメーションについて予測される自由エネルギーよりも小さくある（即ち、より安定である）べきである。この総エネルギーレベルは、塩基組成及び塩基対の数を包含する幾つかの因子に基づいて調節されることができる。標準的温度条件下では、相補的オリゴヌクレオチ

ドは、7以下のヌクレオチドを有するべきである。というのは、8ペアのヌクレオチドから形成されるシステムはそのコンフォメーションのままであるようなので、標的結合性コンフォメーションへスイッチすることができないからである。

【0029】

標準的核酸合成技術を用いて適するアプタマー・ビーコン候補が調製されたら、それらは、望まれる標的分子が予測されたコンフォメーション変化をモジュレートするかどうかみるために、構造確認アッセイで試験されることができる。1つのそのような構造確認アッセイは、 $0.5 \times \text{TBE}$ (0.045 M トリス・ボレート, 0.002 M EDTA, $\text{pH} 8.5$) と 10% グリセロールとを含む 8% アクリルアミドゲル (75:1のビス:アクリルアミド比) 上で行なわれる一本鎖コンフォメーション感受性ゲル電気泳動である。小容量の放射性標識アプタマー・ビーコン候補 ($1 \mu\text{M}$) が、結合性緩衝液 (典型的には、アプタマー選択に使用されたのと同じ緩衝液) 中で標的分子 ($10 \mu\text{M}$) と一緒に又は標的分子なしでインキュベートされる。それらサンプルは、等容量の 50% グリセロール及びプロモフェノールブルー (0.05%) と混合されてから、ゲル中に充填される。電気泳動は冷たい部屋で 300 V で行なわれる。泳動後、ゲルは乾燥され、コダック X-OMA T フィルムへ晩露光される。そのゲルから結果が読み取られて、アプタマー・ビーコン候補のコンフォメーションが標的分子によってモジュレートされたかどうか確認される。理想的には、このアプタマーから確認されることができるよう、アプタマー・ビーコン候補は、標的分子の不存在下では2又はそれを越えるコンフォメーションで存在し、そして、標的分子の存在下では、標的に結合した1つだけのコンフォメーションで存在すべきである。

【0030】

アプタマーが生物工学処理され、場合によりそれらのコンフォメーション変化について分析された後、本明細書に記載のような蛍光分子と消光体のペアのような1又はそれを越えるリポーター基又は部分が、標準的核酸染料、試薬、及び標準的合成法を使用して付加される。次いで、そのアプタマーの有用性を確認するために、以下に記載する検出法が用いられることができる。

本明細書には、標的との結合で非常に大きなコンフォメーション変化を受けるアプタマー・ビーコンが記載されている。しかし、これら新規な方法は、リボザイムに典型的に見られる変化のような、小さいけれども検出可能な変化を受けるアプタマー・ビーコンでも、等しく十分に効果を発揮することができる。

【0031】

固体支持体へのアプタマー・ビーコンの固着 アプタマー・ビーコンを保持するための固体支持体は、ガラススライドのような、例えば、平坦シートガラスであることができる。金属、プラスチック、及びセラミックのような他の固体表面も適する。アプタマー・ビーコンをガラススライドに付けるための1つの技術が図1A及び図1Bに例示されている。

図1A及び図1Bを参照すると、アプタマー・ビーコンは、そのアプタマー・ビーコンの消光体部分6のアミン基をリンカー分子8を介してガラススライドに付けることによって固着されることができる。消光体部分6の目的及び結合は、以下で図3A～3Dを参照しながら説明される。図1A及び図1Bに記載した例では、リンカー分子8は C_6O_4Si であり、そして消光体6は $C_6H_4NH_2$ である。他の公知のリンカー分子及び消光体を使用することができる。

【0032】

まず、リンカー8及び酸性水(pH 3.0)を含む溶液中に90℃で4時間ガラススライドを浸漬することによって、リンカー8がガラススライドに付けられる(図1A)。4時間後、リンカー8はそのスライドの表面にコートされる。次に、アプタマー・ビーコンが、消光体6のアミン基を介してそのスライド上のリンカー分子に付けられる。アミン基を介して付けるため、ガラスのコートされた表面は、アプタマー・ビーコン/消光体のペア及び CH_3CN を含む溶液に20℃で1.5時間曝される。アプタマー・ビーコンは、ロボットマイクロピペッターを使用して、スライド上の正確な点にアプタマー・ビーコン- CH_3CN 溶液の微点滴を落とすことによって、ガラススライド上の特定のスポットに局在させられることができる。例えば、Schena et al., "Parallel Human Genome Analysis: Microarray Based Expression Monitoring of 1000 Genes," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 93: 10514-19 (1996) を参照のこと。

【0033】

図2を参照すると、長いリンカーを有するアプタマー・ビーコンは、消光体を介さずに直接ガラススライドに付けられることができる。種々の公知のリンカー分子を使用することができる。長いリンカーは、アプタマー・ビーコンがスライドの上にある液体中に更に伸びてゆくのを可能にして、標的分子の結合を容易にする。図2に示したアプタマー・ビーコンを付けるための操作は、図1Bのアプタマー・ビーコン/消光体を付ける操作に類似している。(図2に示した蛍光体22及び消光体24は、図3A～3D及び図4A～4Dを参照しながら、以下で説明される。)

オリゴヌクレオチドをガラスに付けるための他の方法は、Shalon et al., "A DNA Microarray System for Analyzing Complex DNA Samples Using Two-Color Fluorescent Probe Hybridization," Genome Res.,

6:639-45(1996) (オリゴヌクレオチドがポリーレーリシンをコートした表面にUV架橋される)、及び Morgan と Taylor, "A Surface Plasmon Resonance Immunosensor Based on the Streptavidin-Biotin Complex," Biosens. Bioelectron., 7:405-10 (1992) (アプタマーがストレプトアビジンを使用して付けられる)に記載されている。

【0034】

異なる標的分子に結合するように配置される異なるアプタマー・ビーコンが、スライドの異なる点に付けられることができる。例えば、異なるアプタマー・ビーコンが、2次元アレイ中の異なる点に置かれることができる。アレイ中の各点は、例えば、上で図1A及び1Bを参照しながら説明したように、スライド上に一滴として落とされた同一のアプタマー・ビーコンの1スポットを含有することができる。各々のスポットは、約 10^7 個のアプタマー・ビーコンを含有することができる。諸スポットは、ロボットマイクロピペッターを使用すると、300ミクロンという近さで隔たっているだけなので、例えば、約 1.8 cm^2 の表面積を有する典型的なガラススライドは、例えば、約6000スポットの異なるアプタマー・ビーコンを保持することができる。例えば、Lashkari et al., "Yeast Microarrays for Genome Wide Parallel Genetic and Gene Expression Analysis," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 94:13057-62 (1997)を参照のこと。

【0035】

関連するスポットのアプタマー・ビーコンが、スライド上で一緒にクラスターにグループ化されることができる。例えば、薬物試験において、特定の薬物、例えば、コカインの異なる代謝産物に結合するように配置されるアプタマー・ビーコンの諸スポットがそのアレイの1つの領域又はクラスターと一緒にグループ化され、そして、別の薬物、例えば、LSDの代謝産物を検出するように配置される諸スポットが第2の領域と一緒にグループ化されることができる。加えて、標的上の異なる結合部位、例えば、抗原の異なるエピトープを検出するよう指向されたアプタマー・ビーコンの異なる諸スポットが、一緒にクラスターにグループ化されることができる。関連するスポットをアレイ中のクラスターに統合することで、結果の解析を簡略化することができる。

アプタマー・ビーコンは、電子産業で公知のフォトレジストマスキング法を使用して、スライドに付けられることもできる。そのような技術は、既に核酸検出のためのDNAオリゴヌクレオチドチップに適合されており、1つのアレイ中の各点に、そして、例えば、 1.64 cm^2 アレイ上の、例えば、約 6.5×10^4 の点に、例えば、約 10^7 コピーのアプタマー・ビーコンを有するアプタマー・ビーコンアレイの大量生産を可能にするであろう。例えば、Pease et al., "Light Generated Oligonucleotide Arrays

【0036】

標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合の検出 アプタマー・ビーコンの標的分子への結合を検出するための種々のスキームが用いられることができる。第1に、アプタマー・ビーコンのリポーター基は、例えば、蛍光効力の変化がモニターされる蛍光リポーターであることができる。第2に、標的分子の存在によって生じるアプタマー・ビーコンのラマン発光の変化が観察されることができる。第3に、アレイの表面における表面プラズモン共鳴のシフトが、吸収光の波長又は入射角の変化をモニターすることによって、又は Mach-Zehnder 干渉計を使用することによって検出されることができる。第4に、リポーター基又は部分は、アプタマー・ビーコンが標的分子への結合でコンフォメーションを変化させるときに起こる物性の変化をモニターすることができる酵素又は化学物質であってもよい。

【0037】

A. 蛍光をベースとする検出 蛍光発光をモニターすることによって結合を検出するために、蛍光体が、アプタマー・ビーコンのリポーター基内に組み込まれることができる。これらリポーター基は、標的分子が、アプタマー・ビーコンに結合して、そのアプタマー・ビーコンのコンフォメーションを変化させることにより、サンプル中におけるその標的分子の存在の信号を発するときに、それらリポーター基の蛍光効力が変化するように配置される。蛍光効力は、例えば、極微波(evanescent wave) 励起及び冷却 C C カメラ又は単一光子計数検出器を使用して測定されることができる。

【0038】

1. 蛍光体リポーター基 蛍光体リポーター基は、例えば、アプタマー・ビーコン中のコンフォメーション変化の信号を発する蛍光エネルギー移動ペアであることも、その効力がアプタマー・ビーコンのコンフォメーションに依存する慣用的な蛍光標識であることもできる。

アプタマー・ビーコンリポーター基は、例えば、図3A～3Dに示すような蛍光体と消光体であっても、図4A～4Dに示すような電荷又はエネルギー移動系であってもよい。図3A～3Dを参照すると、アプタマー・ビーコン10a及び10bは、ループ部分12a及び12b、ステム部分14a及び14b、及び標的分子18a及び18bそれぞれに結合するように配置された結合領域（太線）16a及び16bを含む。アプタマー・ビーコン10aにおいて、結合領域16aは完全にループ部分12a内にあるが、アプタマー・ビーコン10bにおいては、結合領域16bはループ部分12bとステム部分14bに跨がっている。

リポーター基 2 0 は、両方ともステム 1 4 a 及び 1 4 b に付いている蛍光体 2 2（五角形として表されている）及び消光体 2 4（四角形として表されている）を含むことができる。図 3 A 及び 3 C に示すように、消光体 2 4 が蛍光体 2 2 の近くに位置すると、蛍光体 2 2 は消光されているので、励起されてもあまり蛍光を発しない。図 3 B に示すように、蛍光体 2 2 と消光体 2 4 が離れると、蛍光体 2 2（今度は星形で表されている）は、より効率的に有意に蛍光を発する。

【0039】

標的分子 1 8 a 及び 1 8 b の結合領域 1 6 a 及び 1 6 b への結合は、ステム 1 4 a 及び 1 4 b における塩基対結合を壊して、蛍光体 2 2 を消光体 2 4 から離してしまう。蛍光体 2 2 を励起させてその蛍光効力を測定することにより、観察者は、結合した標的分子の存在又は不存在を推定することができる。

蛍光体 2 2 は、例えば、5-（2'-アミノエチル）アミノナフタレン-1-スルホン酸（EDANS）、フルオレセイン、又はアントラニルアミドであることができる。消光体 2 4 は、例えば、4-（4'-ジメチルアミノフェニルアゾ）安息香酸（DABCYL）、ローダミン、又はエオシンであることができる。

蛍光体 2 2 及び消光体 2 4 は、当該技術分野で公知の技術によりアプタマー・ビーコン 1 0 a 及び 1 0 b 内に組み込まれることができる。例えば、Tyagi と Kramer, "Molecular Beacons: Probes That Fluoresce Upon Hybridization," Nature Biotech., 14:303-08 (1996)を参照のこと。

【0040】

リポーター基は、エネルギー移動系も包含することができる。図 4 A ~ 4 B を参照すると、アプタマー・ビーコン 4 0 a は、標的分子 4 6 a に結合するように配置された結合領域 4 4 a を伴うオリゴヌクレオチド 4 2 a を有する。リポーター基 4 8 は、オリゴヌクレオチド 4 2 a に付いたアクセプター／蛍光発光部分 5 0（五角形として表されている）とドナー／エネルギー吸収部分 5 2（三角形として表されている）を含む。図 4 B に示すように、発光部分 5 0 と吸収部分 5 2 が近くにあるとき、エネルギーがそれら部分間を移動して、発光部分 5 0（今度は星形として表されている）が効率的に蛍光を発する。しかし、図 4 A に示すように、発光部分 5 0 と吸収部分 5 2 が離れると、それら部分間にエネルギー移動が起こらないので発光部分は蛍光を発しない。

【0041】

標的分子 4 6 a の結合領域 4 4 a への結合は、塩基対結合をシフトさせることによりアプタマー・ビーコン 4 0 a のコンフォメーションを変化させる。標的分子 4 6 a が結合領域 4 4 a に結合されないときは、オリゴヌクレオチド 4 2 a のセグメント 5 4 がセグメント 5 6 とハイブリダイズする。しかし、標

的分子46aが結合すると、セグメント54はセグメント58とハイブリダイズする。標的分子46aの結合でのアプタマー・ビーコン40aのコンフォメーションの変化は、発光部分50と吸収部分52を近付けさせて、それら部分間のエネルギー移動を可能にするので、部分50により効率的発光が可能になる。従って、リポーター48の蛍光効力をモニターすることによって、観察者は、標的分子46aの存在又は不存在を推定することができる。

【0042】

図4C～4Dは、異なるアプタマー・ビーコン上の同じエネルギー移動系の作用を例示している。アプタマー・ビーコン40bは、標的分子46bに結合するように配置された結合領域44bを伴うオリゴヌクレオチド42bを有する。蛍光発光部分50とエネルギー吸収部分52がオリゴヌクレオチド42bに付けられている。標的分子46bが結合領域44bに結合する前は、セグメント60はセグメント62とハイブリダイズし、そしてセグメント64はセグメント66とハイブリダイズしている。しかし、標的分子46bが結合すると、アプタマー・ビーコン40bがコンフォメーションを変化させるので、セグメント62がセグメント64にハイブリダイズし、そしてセグメント60とセグメント66はハイブリダイズしないままになる。

蛍光発光部分50は、例えば、Cy5であることができる。吸収部分52は、例えば、フルオレセイン又はテトラメチルローダミン（TMR）であることができる。

【0043】

発光部分50と吸収部分52は、当該技術分野で公知の技術を使用して、オリゴヌクレオチド42aと42bに付けられることができる。例えば、Sixou et al, "Intracellular Oligonucleotide Hybridization Detected by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)," *Nucleic Acids Res.*, 22:662-68 (1994) を参照のこと。

エネルギー移動リポーターを伴うアプタマー・ビーコンを設計する代わりに、当該技術分野で公知の他の蛍光リポーターを用いることができる。例えば、アプタマー・ビーコンは、その蛍光効力がそれが付いている分子の化学環境に依存する蛍光体で標識されることができる。標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合がそのアプタマー・ビーコンのコンフォメーションを変化させることによって、その蛍光体の化学環境が変化し、それによって、その蛍光体の蛍光に検出可能な変化が生じるのである。

【0044】

2. 表面をベースとする蛍光検出系 リポーターの蛍光効力をモニターするための検出系は、蛍光体を励起するための極微波励起、及び蛍光を測定するための冷却CCDカメラ又は単一光子計数検出器を用い

ることができる。

図5は、極微波励起の一般的原理を示している。図5において、境界110が屈折率 n_1 を有する第1媒体112を屈折率 n_2 を有する第2媒体114から分離させている。ここで、 n_2 は n_1 より大きい。光線116が、第2媒体114を通して θ° の入射角で境界110に届く。 θ が内部全反射のための臨界角度より大きいとき、光線は境界110で全反射する。ここで、臨界角度は $\arcsin(n_2/n_1)$ に等しい。光が境界110で内部全反射するという事実にも拘らず、伝播波118からの僅かなエネルギーが第1媒体112に入る。媒体112内に伝播する波118は極微波と呼ばれ、それは、表皮厚さとして知られる波長依存性の距離だけ第1媒体112内に透過する。この表皮厚さは、光の波長、表面におけるビームの入射角、及び両方の材料の屈折率の関数である。表皮厚さは、典型的には、可視光については数百ナノメートルのオーダーであり、境界110から指数関数的に減衰する。従って、極微波118は、表皮厚さを越える分子を邪魔することなく境界110又はその近傍における分子を励起するのに使用されることができる。

【0045】

図6を参照すると、極微波励起を採用する蛍光検出系130は、レーザー132；カバースリップ135を有する内部反射プリズム134；レンズ136、及び検出器138を含む。

図7を参照すると、カバースリップ135が、例えば、オイルのような屈折率マッチング液体を使用するガラスプリズム134に、空気がそれらを離さないように固着されている。プリズム134、カバースリップ135及びそのオイルの全ては、プリズム134とカバースリップ135との間に光学的境界が存在しないように類似の屈折率を有する。

カバースリップ135は、第1媒体（ガラス）と第2媒体（空気）との間に境界を形成する上部表面150を有する。表面150に付いているのは、アプタマー・ビーコン10a、10b、10cである。アプタマー・ビーコン10a、10b、10cの各々は、消光体型リポーター20を有する。標的分子18は、アプタマー・ビーコン10cに結合するが、アプタマー・ビーコン10a及び10bには結合しない。

【0046】

リポーター20内の蛍光体22a、22b及び22cを励起させるために、光線152がプリズム134を通過して表面150で内部全反射される。極微波（示されていない）が表面150からアプタマー・ビーコン10a、10b、10cまで進んで、蛍光体22a、22b及び22cを励起させる。

蛍光体 2 2 a 及び 2 2 b は消光されているので、それらは効率的に蛍光を発しないであろう。しかし、蛍光体 2 2 c は消光されていないので、標的分子 1 8 の結合前よりも大きな蛍光を示すであろう。これら結果から、観測者は、標的分子 1 8 がアプタマー・ビーコン 1 0 c に結合したが、アプタマー・ビーコン 1 0 a 及び 1 0 b には結合しなかったことを推定できる。

【0047】

光線 1 5 2 はレーザー 1 1 2 により発生される。レーザー 1 1 2 は、例えば、4 5 8 nm ~ 5 3 0 nm の 9 本の目立たないスペクトル線において発光するアルゴンイオンレーザー、6 3 3 nm において発光するヘリウム-ネオンレーザー、又は 6 3 5 nm において発光するダイオードレーザーであることができる。また、光線 1 5 2 は、レーザー 1 1 2 より他の光源によって発生される別の形態の電磁線であってもよい。例えば、光線 1 5 2 は、赤外線、紫外線又はマイクロ波であってもよい。

図 6 に示したように、検出器 1 3 8 は、レンズ 1 3 6 によりカバースリップ 1 3 5 と光学的に連なっている。レンズ 1 3 6 は、光学顕微鏡内のレンズと同じ目的を果たす。また、検出器 1 3 8 は、図 8 に示すように、光ファイバケーブル 1 6 0 によってカバースリップ 1 3 5 と連なってもよい。光ファイバケーブル 1 6 0 のインプットは、表面 1 5 0 の非常に近くに位置する。

検出器 1 3 8 は、例えば、共焦点顕微鏡を有する冷却 CCD カメラ又は単一光子計数検出器である。低レベルの蛍光を認識する検出器 1 3 8 の能力を最大限にするために、バックグラウンド光及び迷光は最小限にされるべきである。迷光は、例えば、検出器 1 3 8 に、周囲光を篩分けるスペクトルフィルターを付加することにより及びアレイをラスタリングすること (rastering) (ある時点におけるアレイの 1 本の線を走査して空間的認識力を増すこと) により減らすことができる。

【0048】

3. 溶液をベースとする蛍光検出系 溶液中でのアプタマー・ビーコンのリポーター基の蛍光効力をモニターするための検出系は、レーザーのような光源；レンズのような焦点に集める光学素子；蛍光励起又は発光スペクトルの変化をもたらすためのフィルター又はモノクロメーター；溶液を保持するためのチャンバー；及び蛍光を測定するための冷却 CCD カメラ又は単一光子計数検出器を含むことができる。

図 1 2 は、液相検出方法で使用するための検出系 3 0 0 を示している。アルゴンイオンレーザーのようなレーザー 3 1 0 が光源として使用されることができる。この例では、レーザー光は、4 8 8 nm バンドパスフィルター 3 2 0 にかけてフルオレセイン標識リポーター基を励起するか、又は 5 1 4 nm バンドパスフィルターにかけてローダミン標識リポーター基を励起して、複数標的の検出を可能に

する。次いで、光線は、サンプル容器 3 3 0 に衝突して、サンプル中の蛍光を励起させる。そのサンプル容器は、溶液を入れたキューベットであっても、溶液を流し込んだキャピラリーであってもよい。次いで、蛍光アウトプットが、レンズ又は他の光収集光学素子 3 4 0 によって集められる。次いで、その蛍光アウトプットは、励起光を除くため及び場合により標的認識を提供するために、フィルター 3 5 0 にかかけられる。この例では、5 1 5 ~ 5 2 5 n M バンドパスフィルターがフルオレセイン標識リポーター基を検出するために使用され、そして 5 6 0 ~ 5 8 0 n M バンドパスフィルターがローダミン標識リポーター基を検出するために使用され得る。この例示では、フィルターにかかけられた光は、次いで、レンズ 3 6 0 により焦点に集められる。最後に、発光した蛍光が、冷却 C C D カメラ又は単一光子計数検出器 3 7 0 により検出される。

【0049】

B. ラマン発光のモニター 標的分子の結合は、アプタマー・ビーコンのラマン発光の変化を観察することによっても検出され得る。例えば、Angel et al の米国特許第 4, 7 8 1, 4 5 8 号を参照のこと。ラマン発光を測定する実験的プロセスは、蛍光効力の測定について上記したプロセスと類似している。スライド又はカバースリップの表面に結合したアプタマー・ビーコンは極微波によって励起され、そしてラマン発光が C C D カメラ又は単一光子計数器を使用して測定される。非常に弱いラマン発光信号を単離するために、適切なカットオフフィルターが検出器に適用されてもよい。

共鳴及び非共鳴ラマン励起の両方を使用することができる。必要なら、ラマン発光は、支持体の表面コーティングを変えることにより、例えば、銀、金又は白金を添加することにより、増大されてもよい。例えば、米国特許第 4, 7 8 1, 4 5 8 号を参照のこと（前出）。

【0050】

C. 表面プラズモン共鳴のモニター 標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合は、支持体の屈折率の局部的変化を生じ得る。これら局部的変化は、アプタマー・ビーコン溶液とガラス支持体との間の界面に堆積された金属薄膜内での表面プラズモン共鳴の変化をモニターすることにより測定されることができ

る。金属中の電子は、濃厚物プラズマ(condensed matter plasma)としてモデル化されることができる。そのプラズマの表面における自由電子は、特徴的な密度ゆらぎ又は“表面プラズモン振動”を示す。この表面プラズモンは、例えば、極微波を使用して励起されて共鳴することができる。例えば、米国特許第 5, 4 8 5, 2 7 7 号を参照のこと。内部全反射線ビームが表面プラズモンを励起させて共鳴が起こると、反射波の周波数が鋭敏に低下する。従って、表面プラズモンを励起させて共鳴させる正確な入射角

が、入射角の関数としての反射波のエネルギーのグラフにおいて、鋭い低下率として検出される。

【0051】

標的分子が、金属薄膜に付けられたアプタマー・ビーコンに結合すると、その点における局所屈折率が変化して、表面プラズモンを励起させて共鳴させるのに要求される特定の波長及び／又は入射角がシフトする。従って、標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合（大きな数の同一標的分子の、アレイ内のアプタマー・ビーコンスポット内における同一アプタマー・ビーコンへの結合）は、表面プラズモンを励起させて共鳴させるのに要求される波長又は入射角のシフトのいずれかを観察することにより、検出されることができる。

表面プラズモン共鳴条件のシフトを測定することによる標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合を検出する系は、例えば、真空蒸着された銀膜を有する石英プリズムを含むことができる。表面プラズモン共鳴検出のために、ビームは、入射角円錐が同時に測定され得るように、プリズム内に向けた焦点に集められる。その内部全反射したビームは、平行にされ、そして、例えば、CCDカメラに結像される。その共鳴角条件は、そのビームプロファイルにおいて暗いバンドとして現れる。標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合が、共鳴条件のシフトを起こし、それがそのビームプロファイルにおける暗いバンドの空間的シフトに翻訳されるのである。

【0052】

表面プラズモン共鳴条件の変化は、Mach-Zehnder干渉計（MZI）を使用して観察されることもできる。MZIでは、コヒーレントビームが2本の等しい光路長足（path-length legs）として送り出され、それら2本のビームが再合体するアウトプットにおいてそのビームの完全破壊的干渉（total destructive interference）をもたらす。それら足のうちの1本の効果長さを、例えば、その足内のある点において屈折率を変えることによって変化させると、破壊的干渉条件が破壊される。MZIは、入射光の波長の一部分ほどの小さな光路長変化にも感受性である。例えば、Kusunose et al, 米国特許第5, 771, 079号を参照のこと。

【0053】

導波管として本質的に働く1本様式光ファイバーを有するMZIが、標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合を検出するために構築されることができる。表面プラズモン振動を誘発する金属膜コーティングが、その光ファイバー導波管の長さに沿って堆積され、そして、アプタマー・ビーコンがその膜コーティングに付けられる。

MZIは、最初、膜コーティングを有する光路長足内でビームが表面プラズモン共鳴を引き起こすよう

に調節され、そして2本の光路長足が相の外で再合体して、完全破壊的干渉をもたらす。しかし、膜コーティング上のアプタマー・ビーコンへの標的分子の結合が、その光路長足内の共鳴条件を変化させ、干渉計のアウトプットにおける完全破壊的干渉のための条件を破壊する。かくして、そのアウトプットの光を検出することは、標的分子がそのMZIの1本の光路長足上のアプタマー・ビーコンに結合したことを示すことになる。再合体光の強度を測定すると、結合した標的分子の量を知ることができる。

【0054】

D. 他の検出スキーム 標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合を検出する他のスキームも使用することができる。例えば、蛍光体より他のリポーター基が、アプタマー・ビーコン内に組み込まれることができる。そのリポーター基は、標的分子の結合により生じるアプタマー・ビーコンのコンフォメーション変化の信号を発することも、その標的の性質を変化させるやり方で標的分子と相互作用することもできる。そのようなリポーターは、例えば、結合した標的にエネルギーを移動させる荷電部分であることができる。これらリポーターの例には、タンパク質酵素が含まれる。

アプタマー・ビーコンは、導電性ポリマーであって、標的分子のアプタマー・ビーコンへの結合及びその結果としてのアプタマー・ビーコンのコンフォメーションの変化が、そのポリマーにコンフォメーション変化を生じさせて、その導電率を変えてしまうところの、ポリマーに付けられることができる。導電性の変化は、例えば、そのポリマーを横断する抵抗を測定することにより確認することができる。

【0055】

別の方法では、アプタマー・ビーコンが、標的分子の結合により誘発されるコンフォメーションの変化で化学反応を触媒するように設計されることができる。次いで、結合した標的分子の存在が、その反応の生成物を検出することによって推定される。

標的分子の存在は、2成分アプタマー・ビーコン系を使用して検出されることができる。図9Aを参照すると、アプタマー・ビーコン成分70及び72は、標的分子78上の離れた（例えば、異なる）結合部位74及び76に結合する結合部位を有している。アプタマー・ビーコン成分70が蛍光標識80を有する一方で、アプタマー・ビーコン成分72はガラス支持体82に付いている。溶液をベースとする測定には、72を82に付ける必要がないことに留意しなければならない。

【0056】

サンプル中の標的分子78の存在を検出するには、サンプルをまずアプタマー・ビーコン成分70を含

む溶液と混合する。標的分子78が存在すれば、それらはアプタマー・ビーコン成分70上の結合部位74に結合するであろう。次に、このサンプル／溶液混合液は、支持体82に曝される。すると、標的分子は、結合部位76を介して支持体上のアプタマー・ビーコン成分72に結合するであろう。次いで、アプタマー・ビーコン成分72に結合した標的分子78の存在が、標識80の蛍光を観察することにより検出されることができる。また、溶液中の標的分子78は、アプタマー・ビーコン成分72がその上に結合させられた、容器に加えられても、ガラススライドのような固体支持体82上に注がれても、落とされてもよい。あらゆる未結合標的分子78が洗い落とされ、次いで、標識されたアプタマー・ビーコン成分70がその容器又は固体支持体に加えられ、そこで、それらは、アプタマー・ビーコン成分72によって固体支持体82に結合したあらゆる標的分子78に結合する。

【0057】

図9Bは、別の2成分アプタマー・ビーコン検出系を示す。図9Bでは、支持体82に結合したアプタマー・ビーコン成分86が、セグメント96に付けられたエネルギー吸収部分88を有し、そして、アプタマー・ビーコン成分90が、セグメント98に付けられた蛍光発光部分92を有する。両方のアプタマー・ビーコン成分86及び90の標的分子94への結合は、上で図4A～4Dを参照しながら説明したように、セグメント96をセグメント98に近づかせて、それら部分間のエネルギー移動を可能にすることにより、蛍光発光部分92に蛍光を発光させる。エネルギーは、吸収部分88から発光部分92へ、それら部分間の距離 S_1 が100・未満の長さであれば移動するであろう。

【0058】

吸収部分88と発光部分92との間のエネルギー移動の効率を向上させるため、アプタマー・ビーコン成分90及び86が両方とも標的分子94に結合したときに、セグメント98及び96が互いにハイブリダイズするように、セグメント98及び96を配置してもよい。例えば、ハイブリダイゼーションを可能にするため、ポリA及びポリTテールが、セグメント98及び96のそれぞれに付加されてもよい。また、より複雑な相補的配列をセグメント98及び96に付加して、他のポリヌクレオチド、例えば、他のアプタマー・ビーコン上のポリヌクレオチドテールが非特異的にセグメント98及び96にハイブリダイズする可能性を少なくすることができる。

加えて、上の検出系とは別に又はそれらと一緒に、質量分析を使用して、結合した標的分子を更に同定又は更に定量することができる。

他の検出系も請求の範囲内である。

【0059】

アプタマー・ビーコンアレイの用途及び解釈 上記のアレイ系は、例えば、ヒト又は動物における能力増強又は非合法薬物の試験；毒物、夾雑物、添加物又は遺伝子工学成分についての食品の試験；法廷試験；一般的健康診断；特定疾患、例えば、癌の同定及び疾患の進行のモニター；汚染物の検出又は汚染源の追跡；環境バランスのアッセイ（健康な川、湖、湿原、土壌及び空気）；生物学的危険物質の検出；化学的毒物又は化学物質の検出；例えば、空港における爆発物又は非合法薬物の検出；環境における花粉及び他のアレルゲンの検出；特定の環境における特定のタイプの動物又は魚類、例えば、海水浴場におけるサメ、湖又は川におけるマスの存在の検出；及び薬剤発見のための標的特定を包含する、種々の異なる分野で使用されることができる。

【0060】

複数の異なる標的的存在についてのサンプルの同時試験に加え、本アレイは、複数の異なるやり方で標的に結合することによって、単一標的的存在についても試験することができる。そのような試験は、慣用的な標的分子アッセイよりも大きな感度を有するであろう。

例えば、単一標的の異なる結合部位に結合するように配置又は選択された異なるスポットのアプタマー・ビーコンを有するアプタマー・ビーコンアレイを構築することができる。それら異なるアプタマー・ビーコンスポットは、例えば、単一抗原の異なるエпитープ、同じタンパク質の異なる結合部位、又は単一細菌の異なる表面タンパク質に結合するように配置されることができる。同じ標的の異なる結合部位に結合するように設計又は選択されたアプタマー・ビーコンを含有する異なるスポットは、1つのクラスターと一緒にグループ分けされることができる。その検出系が、諸標的がそのようなクラスター内の全て又は殆ど全てのアプタマー・ビーコンスポットに結合したなら、観察者は、その標的がそのサンプル中に存在することを大きな確信をもって結論付けることができる。

同様に、アプタマー・ビーコンアレイ又はアプタマー・ビーコンスポットのクラスターは、ある分子の異なるエナンチオマー又はある分子式の異なる異性体について試験するために構築されることができる。

【0061】

図10A及び10Bは、食品中の有害毒物を検出するための簡単なアプタマー・ビーコンをベースとするアッセイの用途と解釈を示すものである。図10Aを参照すると、カバースリップ180に結合したアプタマー・ビーコンアレイ178が、各々3スポットずつの3行に配置された9スポットのアプタマー・ビーコンを含んでいる。1行目のスポット182a、182b、及び182cは、*Clostridium botulinum* の3つの異なるエпитープに結合するように選択されたアプタマー・ビーコンを含有する。

2行目のスポット184a、184b、及び184cは、サルモネラ菌の3つの異なるエピトープに結合するアプタマー・ビーコンを含有する。3行目のスポット186a、186b、及び186cは、特定の食品に天然に見られる3種の異なる保存性物質に結合するように選択されたアプタマー・ビーコンを含有する。しかし、これら保存性物質は、あまり多い量が存在すると有害であり得る。各々のスポットは、例えば、約 10^7 個の同一アプタマー・ビーコンを含有する。各々のアプタマー・ビーコンは、図3A～3Dを参照しながら上で説明したような蛍光体－消光体のペアを含む。

【0062】

実地において、試験される食品は、溶媒、例えば、水に溶解されて、カバースリップ180と接触させられる。次いで、カバースリップ180が、内部全反射プリズムの頂上に置かれて、図5～7を参照しながら上で説明したように、アプタマー・ビーコン内の蛍光体が極微波励起で励起される。励起後のアレイのCCD像188が図10Bに示されている。

このアッセイの結果は、肉眼検分により解釈されることができる。182a、182b、及び182cに蛍光が存在しなかったことは、*Clostridium botulinum* はサンプル中に存在しなかったことを示している。しかし、184a、184b、及び184cに蛍光が存在したことは、サルモネラ菌が存在したことを示している。

【0063】

食品中に普通に見られる保存性物質を標的にしたスポット186a、186b、及び186cは、予想通り全て蛍光を発している。しかし、各々のクラスター内の蛍光の量を解析して、サンプル中に存在する各々の保存性物質の濃度を決定することができる。サンプルが高濃度の保存性物質を有するなら、より多くの保存性物質の分子が対応するスポット内のアプタマー・ビーコンに結合して、そのスポットのより大きな蛍光総量をもたらすことになる。例えば、図10Bでは、スポット186aは、スポット186b及び186cよりも多くの蛍光を発しているので、高濃度のその特定保存性物質を示していることになる。

保存性物質の濃度が危険なほど高いかどうかを肉眼で確認するために、特定スポットの明るさ、例えば、スポット186aに関連する蛍光を、正常濃度についての蛍光レベルを示すテンプレートと比較することができる。加えて、より定量的なデータを得るため、このアプタマー・ビーコンシステム、及び高濃度から低濃度に変動する幾つかの公知濃度の所与の保存性物質（又は他の標的）のサンプルを用いて、各々の保存性物質（又は他の標的）についての濃度“曲線”又は対照研究を確立することができる。

【0064】

パターン認識及び解析ソフトウェア 図10A及び10Bを参照しながら上で説明したアダプター・ピーコンを使用するに際して、アッセイの結果は、肉眼検分によって簡単に確認されることができる。しかし、上で述べたように、より複雑なアダプター・ピーコンをベースとするアッセイは、2次元アレイ内に数十又は数千のスポットのアダプター・ピーコンを有することができる。他のアレイ、例えば、3次元も作成することができる。そのようなアッセイの結果は、肉眼検分によっては容易に分からないであろう。

より複雑なアッセイの結果を解析するのを支援するために、以下に説明するように、新規なパターン認識及び解析ソフトウェアを使用することができる。

簡単に説明すると、まず、そのソフトウェアは、検出系からのアウトプットを解析して、サンプル中に存在する化合物の同一性及び量を決定する。次に、そのソフトウェアは、サンプル中に存在する化合物のリストを、正常条件下で存在すると考えられる化合物のリストと比較し、そしてあらゆる偏差を記録する。次いで、ソフトウェアは、その偏差を既知のアッセイ結果のライブラリーと比較することによって、その偏差を解釈して、解説又は説明しようと試みる。

【0065】

例えば、蛍光をベースとする検出系を使用して、例えば、21歳女性の血液を非合法薬物について試験するに際して、そのソフトウェアは、まず、スライドを血液サンプルに曝した後、そのスライド上に形成される蛍光パターンを解析する。どのアダプター・ピーコンスポットが蛍光を発したか、及びどれくらい多くの蛍光を発したかを記録することによって、そのソフトウェアは、そのサンプル中のどのような化合物がどれくらい存在しているかを確認する。次いで、そのソフトウェアは、その化合物リストを、薬物を使用していない21歳女性の血液中に存在すると考えられる化合物のリストと比較して、あらゆる偏差を確認する。見出された偏差は、非合法薬物、例えば、コカインの存在によって生じることが知られている偏差と比較される。次いで、そのソフトウェアは、それら結果を有意性について試験して、存在する非合法薬物のリストを画面表示する。

【0066】

図11A及び11Bは、パターン検出プロセスを示している。図11Aは、存在する化合物の同一性及び量を決定して、リスト、即ち、信号化合物プロファイルを構築する、そのソフトウェアの第1任務の段階及び遂行を示しており、図11Bは、その信号化合物プロファイルを既知プロファイルと比較す

る、そのソフトウェアの第2任務の段階及び遂行を示している。

図11Aを参照すると、このソフトウェアは、まず、典型的には像であるところの検出系からのアウトプットを受け取り、その像をデジタル生計器信号210に変換する。像をデジタル信号に変換するため、そのソフトウェアは、その像を、各々がそのアレイ内の1種のアプタマー・ビーコンに対応する数セクターに分割し、そしてそれらセクター内の信号の強度をデジタル表示に変換する。それらセクターのデジタル表示は、例えば、行列式として保存される。

次いで、興味の対象外であるアウトプットの部分（即ち、バックグラウンドノイズ）を排除するために、バックグラウンド212が生計器信号210から差し引かれる。例えば、近くの工場により排出された汚染物についての河川水の試験において、例えば、バックグラウンド212は、その工場より上流の河川水がアプタマー・ビーコンに曝される場合に生じるアウトプットであることができる。バックグラウンド212を差し引いて得られるデータが実信号214である。

【0067】

次いで、実信号214は、信号ライブラリー216のデジタル信号と比較される。信号ライブラリー216は、同じアレイを特定の既知の化合物に曝して得られる諸信号を含む。このソフトウェアは、実信号214を、信号ライブラリー216内の異なる信号の組合せと比較して、実信号214に最も密接に合致する既知化合物信号の組合せを見出す。このソフトウェアは、例えば、最少二乗法 (least squares fitting method)、又は最大可能性及び最大エントロピー法のような公知の線形若しくは非線形デコンボリューション法 (deconvolution techniques) を使用して、最も密接に合致するか又は残りが最小で合致するものを決定する。比較の結果は、2つの別々のアウトプット、即ち、信号化合物プロフィール218及び残り信号220である。

【0068】

信号化合物プロフィール218は、サンプル中に存在するライブラリー化合物、存在する各々の化合物の量、及び関連不確定のリストである。信号化合物プロフィール218は、例えば、行列式として保存されることができる。残り信号220は、信号ライブラリー216からの選ばれた信号の組合せによって占められない実信号214の成分である。

残り信号220は、生計器信号210及び実信号214のように、例えば、行列式として保存されることができる。残り信号220は、その行列式内の各々の要素を、実信号214の内の対応する要素についての不確定レベルと比較することによって、有意性について試験される。有意であるとされた要素は、未知化合物信号222として標識され、例えば、モニター上に表示され、そして保存される。

【0069】

図11Bを参照すると、そのソフトウェアは、次に、信号化合物プロフィール218を、標準プロフィールライブラリー224からの1又はそれを越える標準プロフィールと比較する。標準プロフィールライブラリー224中の各々の標準プロフィールは、非通常条件が存在する（即ち、アッセイ結果が負である）場合に予期される化合物のタイプ及び量のリストである。例えば、21歳女性からの血液サンプルを薬物試験について分析するに際し、関連標準プロフィールは、薬物を使用しない正常な21歳女性からの血液の試験について予期される化合物のリストであろう。河川水を汚染物について試験するに際し、関連標準プロフィールは、問題の季節及び温度においてその河川の特定の点から採取される水に元々見出される諸化合物であろう。

【0070】

多くの場合、信号化合物プロフィール218は、標準プロフィールライブラリー224中の1を越える標準プロフィールと比較されるであろう。それら標準プロフィールは、不確定情報、例えば、正常条件下での関連標準プロフィールの統計学的サンプルから予期されるかも知れない標準偏差も含むことができる。

ある場合には、プロフィールライブラリー224中の関連標準プロフィールは、ユーザーによって予め選ばれるであろう。他の場合には、最も適用可能な標準プロフィールが、そのソフトウェアにより、どの組合せの標準プロフィールが信号化合物プロフィール218に最も近いかを決定することによって選ばれるであろう。

プロフィールライブラリー224から適切な標準プロフィールを選んだ後、そのソフトウェアは、これらプロフィールを信号化合物プロフィール218から差し引いて、標準プロフィールからの偏差226をもたらす。信号化合物プロフィール218のように、偏差226は、化合物及び量のリストであり、例えば、行列式として保存される。

【0071】

次いで、偏差226は、既知偏差ライブラリー227と比較される。既知偏差ライブラリー227中の各々の既知偏差は、特定のアッセイ結果について予期される標準プロフィールからの偏差である。薬物試験において、例えば、既知偏差は、コカインが血液サンプル中に存在するときは、血液に見出される追加の代謝産物のリストであることができる。能力増強ステロイドについては、既知偏差は、正常テストステロンレベルと上昇したテストステロンレベルとの間の差を包含することができる。水質汚染試験では、既知偏差は、近くの工場が河川の中にトリクロロエチレンを投棄したと考えられる場合の偏差

であることができる。

そのソフトウェアは、偏差 226 を、偏差ライブラリー 227 中の既知偏差の異なる組合せと比較して、偏差 226 に最も密接に合致する組合せを見出す。前のように、最も密接に合致するか又は残りが最小で合致するものが、例えば、最少四角形合致法を使用して見出され得る。

【0072】

偏差 226 の既知偏差ライブラリー 227 との比較は、2 つのアウトプット、即ち、信号条件組合せマップ 228 及び残り偏差 230 をもたらす。信号条件組合せマップ 228 は、偏差 226 を偏差ライブラリー 227 と比較することにより見出された既知偏差のリストを含む。例えば、薬物試験では、組合せマップ 228 は、存在する非合法薬物化合物又は非合法薬物化合物の代謝産物、及びそれらが存在する量のリストであることができる。組合せマップ 228 においてリストされた結果は、偏差 226 における不確定データを考慮することによって、統計学的有意性について試験される。有意であるとされた組合せマップ 228 における結果は画面表示され、及び／又は最終結果条件マップ 232 として保存される。薬物試験では、例えば、条件マップ 232 は、サンプル中に存在する非合法薬物の代謝産物をリストするかも知れず、又はその個体が摂取したであろう非合法薬物を同定するかも知れない。水質汚染試験では、この条件マップは、近くの工場により放出された汚染物をリストするかも知れない。

【0073】

残り偏差 230 は、偏差ライブラリー 227 における既知偏差の組合せによっては説明できない化合物同定及び量である。残り偏差 230 は、有意性についてスクリーニングされてから、画面表示され、及び／又は未知条件信号 234 として保存される。未知条件信号 234 は、見出されたものの、いかなる既知アッセイ結果からも説明できない化合物及び量のリストである。

このソフトウェアは、残り信号 220 における新たな化合物、及び残り偏差 230 における新たなパターンを同定できるようになれる。異なる時期及び場所で採取された複数のサンプルを経てきた信号成分の共変動を解析することによって、このソフトウェアは、新たな標準プロファイル及び新たな既知偏差を創作するよう学習することができる。このソフトウェアは、例えば、参照バックグラウンドとして最小ベクターモジュラスを有するサンプルを使用して、例えば、異なる微分解析で、鍛えられることができる。

【0074】

本明細書に記載した方法及び技術は、デジタル電子回路で、又はコンピューターハードウェア、ファームウェア、ソフトウェアで、又はそれらの組合せで実行されることができる。これら技術を用いる装置

には、適切なインプット及びアウトプット装置、コンピュータプロセッサ、及びプログラム可能なプロセッサによる遂行のための機械読取可能な保存装置内に確実に取り込まれたコンピュータプログラム製品が含まれる。これら技術を具体化するプロセスは、インプットデータを働かせて適切なアウトプットを生み出すことによって望まれる機能を実行させる指示プログラムを遂行するプログラム可能なプロセッサにより行なわれることができる。この技術は、データ及び指示を受け取りそしてデータ及び指示を送るように連結された少なくとも1つのプログラム可能なプロセッサ、データ保存システム、少なくとも1つのインプット装置、及び少なくとも1つのアウトプット装置を包含する、プログラム可能なシステムで遂行可能である1又はそれを越えるコンピュータプログラムで実行されることができる。

【0075】

各々のコンピュータプログラムは、高レベル操作用語又は目的指向プログラム用語で、又は望まれるなら、組み立て用語又は機械用語で実行されることができ、いずれの場合も、その用語は、蓄積された用語又は解釈された用語であり得る。適するプロセッサには、例として、一般及び特殊目的の両方のマイクロプロセッサ含まれる。一般に、プロセッサは、リードオンリメモリー及び／又はランダムアクセスメモリーから指示及びデータを受け取るであろう。コンピュータプログラムに指示及びデータを確実に取り込むのに適する保存装置は、例えば、EPROM、EEPROMのような半導体メモリー装置、及びフラッシュメモリー装置；内部ハードディスク及び取り出し可能ディスクのような磁気ディスク；光磁気ディスク；及びCD-ROMディスクを包含する、全ての形態の非揮発性メモリーが含まれる。上述のいずれも、特別仕様のASIC（用途限定集積回路）によって補充されることも、それらの中に組み込まれることもできる。

上記のコンピュータプログラム及び方法は、本明細書に記載したアプタマー・ビーコン検出系より他の生物学的アッセイの結果を解析するのに適合させることができる。この方法及びソフトウェアは、サンプル中の既知化合物の存在を検出するようにデザインされたあらゆる生物学的アッセイに適用することができる。

【0076】

【実施例】

本発明は、以下の実施例において更に説明される。それらは、請求の範囲に記載された発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1 : 薬物試験 この実施例では、26歳のスポーツ選手から採取した血液サンプルが能力増強薬物の存在について試験される。

まず、アンドロステンジオン、アンフェタミン、テストステロンをベースとするステロイド、及び他の薬物を包含する、数十種の既知能力増強薬物の存在について試験するために指向されたマイクロアレイスライドが調製される。それら薬物の代謝産物が文献及び実験から同定される。

アプタマー選択操作が生理食塩緩衝液中で行なわれ、薬物に直接に又はその薬物の代謝産物に結合するアプタマーが選択される。選択されたアプタマーは、長さが25~150ヌクレオチドであって、長さ15~60ヌクレオチドの結合性配列を有するRNAアプタマーである。最小結合配列を決定するために、標準的アプタマー選択法が使用される。次いで、選択されたアプタマーは、図3に示すようなシステム構造ループを含有させるために工学処理される。DABCYL及びEDANSがアプタマーの5'及び3'末端に付けられて、蛍光体リポーター系を伴うアプタマー・ビーコンが作られ、次いで、そのアプタマー・ビーコンは、図2を参照しながら上で説明したやり方で、ガラススライド上に、2次元アレイの形で付けられる。

【0077】

次いで、スポーツ選手の血液サンプルが、アプタマー選択を行なうのに使用されたのと同じ生理食塩緩衝液中に溶解され、一滴の緩衝液-血液サンプル溶液がそのスライドに適用される。そのサンプル溶液の滴は、スライド上のアプタマー・ビーコンアレイを完全に覆う。

サンプルに曝すことは、サンプル中のあらゆる薬物又は代謝産物がアレイ中のアプタマー・ビーコンに結合するのを可能にする。代謝産物の結合は、図3A及び3Bを参照しながら説明したように、蛍光体の消光体をその蛍光体から離すことになるアプタマー・ビーコンのコンフォメーション変化を起こす。サンプルに曝した後、スライドを内部全反射プリズムの上に置く。スライドをプリズムに光学的に連結するために、ガラススライドとガラスプリズムの屈折率に凡そ等しい屈折率を有するオイル (Cargill Laboratories, Inc., N.J. からのLASER LIQUID) をスライドの下の子プリズム上に配置する。そのオイルは、スライドとプリズムとの間にエアポケットができないことを保証する。

【0078】

次いで、適切な波長のレーザーが、内部全反射のための臨界角に凡そ等しい入射角でスライドに届くように、プリズムに適用される。ビームは、スライドの上部（ガラスと空気の間）で内部全反射して、アプタマー・ビーコンアレイ内の未消光蛍光体を励起する極微波を作り出す。この極微波励起から生じた蛍光パターンは、冷却CCDカメラを使用して結像される。

C/Dカメラによって撮られた像は、既知化合物の蛍光パターンテンプレート又はライブラリーと比較されて、存在する代謝産物が確認される。アレイ内のどのアプタマー・ビーコンが蛍光を発したかを検分することによって、血液サンプル中に存在する代謝産物のリストを特定することができる。このリストから、そのスポーツ選手が、最近、具体的な合法的薬物又はステロイドのような非合法的薬物を摂取したかどうか結論付けることができる。

【0079】

実施例2：溶液中のトロニンアプタマー・ビーコン トロニンアプタマー・ビーコンを設計して、それらのトロニン自体への特異性について溶液中で試験し、ファクターIXと比較した。既知のトロニンアプタマーであるG15Dの5'末端に異なる数組のオリゴヌクレオチドを付加すると、元のアプタマーのG-4分子構造内の正常結合性コンフォメーションを崩壊させる互変性非結合性コンフォメーションを示すように設計された生物学処理アプタマーのグループを形成した。これら互変性コンフォメーションは、トロニンに結合しないように設計されている。このアプタマーを含有する溶液にトロニンを加えると、トロニン結合性コンフォメーションへの構造の平衡濃度がシフトした。幾つかの生物学処理アプタマーの5'及び3'末端に付加された蛍光-消光ペアが、蛍光発光を観察することによるアプタマー・ビーコンコンフォメーションの測定を可能にした。幾つかの可能なアプタマー・ビーコン候補の異なるコンフォメーション間の平衡が、ステム領域の組成又は長さを修飾することによって変えられた。

【0080】

図1.3A～Dは、新たに設計されたトロニンアプタマー・ビーコンを示す。トロニン（黒い楕円）のアプタマー・ビーコンへの結合（図1.3A）が、消光ステムループ構造（図1.3D）と未消光コンフォメーション（図1.3B）との間の平衡を変化させ、その際に、直鎖の折り畳まれていない中間体（図1.3C）を通させる。この中間体は、この新たなアプタマー・ビーコンの完全な核酸配列を示している。星形は蛍光要素、例えば、蛍光体を表し、白い四角形は消光体要素、例えば、化学基を表わす。蛍光体の発光強度は星形の大きさによって表され、蛍光体と消光体との間の距離で増加する。かくして、蛍光強度は、図1.3Cで最大、図1.3Dで最小、そして図1.3Aと1.3Bで凡そ等しい。この新たなトロニンアプタマー・ビーコンは、次のようにして調製される。

【0081】

材料：アプタマー・ビーコンを包含する全てのオリゴヌクレオチドは、標準的DNA合成技術を使用して合成された。アプタマー・ビーコン（G15DxxMB）は、その5'末端でフルオレセインを、そ

してその3'末端でD A B C Y L基をカップリングさせることにより合成された。G 1 5 D 5 d Fは、5' -フルオレセインを有するが5'末端でいかなる消光体基も有さないG 1 5 D 5 dである。トロンビン及びファクターIXは、Enzyme Research Lab.から購入された。種々のアプタマー・ビーコン候補を次の通り作った：【0082】

【化1】

G15D	GGTTGGTGTGGTTGG
G15D4d	CCAAGGTTGGTGTGGTTGG
G15D5d	CCAACGGTTGGTGTGGTTGG
G15D6d	CCAACCGGTTGGTGTGGTTGG
G15D7d	CCAACCAAGTTGGTGTGGTTGG
G15D5nd	TTTTTGGTTGGTGTGGTTGG
G15D5drev	CCAACCACACCAAGTTGG

【0083】

競合結合アッセイ：G 1 5 D 5 dが、T 4 -ポリヌクレオチドキナーゼを使用して〔 ^{32}P 〕ATPで放射標識された。トロンビン結合性緩衝液(TBB)(20mMトリス-HCl, 140mMNaCl, 5mMKCl, 1mMMgCl₂、及び1mMCaCl₂, pH7.5)中の放射標識G 1 5 D 5 d(5nM/500cpm)及び0~1 μM の未標識アプタマーが、100 μl のTBB中の10nMトロンビンと混合された。室温で15分間インキュベートした後、それら溶液は2層のフィルター〔ナイロンフィルター(Hybond-PTM)の上にニトロセルロースフィルター(BA85)]を通して濾過された。トロンビン-アプタマー複合体がニトロセルロースフィルター上に濾取され、一方、フリーのアプタマーはナイロンフィルター上に濾取された。各々のフィルター上の放射標識アプタマーの量は、シンチレーションカウンターによるか又はリン保存システム(phosphor storage system)(BioRad)によるかで測定された。

【0084】

一本鎖コンフォメーション感受性ゲル電気泳動：一本鎖コンフォメーション感受性ゲル電気泳動が、8%アクリルアミドゲル(75:1のビス:アクリルアミド比)0.5 \times TBE(0.045Mトリス-ボレート, 0.002MEDTApH8.5)及びゲル中の10%グリセロールで行なわれた。小容量の放射標識アプタマー(1 μM)がTBB中のトロンビン(10 μM)と一緒に又はトロンビンなしでインキュベートされた。それらサンプルは、等容量の50%グリセロール及びブロモフェノールブルー(0.05%)と混合されてから、ゲルに充填された。電気泳動は、冷たい部屋で300Vで行な

われた。展開後、ゲルは乾燥され、コダックX-OMATフィルムへー晩露光された。

【0085】

蛍光分光計を使用するトロンビン結合アッセイ：アプタマーが、TBB又はTE（20mMトリス-HCl, 1mMEDTA, pH7.5）で10μMの濃度に希釈されて99°に3分加熱され、実験前に室温まで冷却された。この実験は、2ml中の5~40nMのアプタマーを使用して行なわれた。全ての蛍光強度測定は24°で行なわれた。励起波長は495nmで、発光はそのピークで、つまり516nm（TE中）又は518nm（TBB中）でモニターされた。小容量のトロンビン（0.5~3μl）（0~250nMの最終濃度）が加えられて発光の変化がモニターされた。

【0086】

捕体配列を含有するオリゴヌクレオチドでの滴定：10μMのG15D5dMBが、TE中の種々の濃度のG15D5drevと混合された。それら混合液は、99°に3分加熱してから、50°で10分間インキュベートされた後、室温まで冷却された。蛍光強度は、40nMの分子状アプタマー・ビーコン濃度で測定された。

G15D4d（ステムの長さが4ヌクレオチド）、G15D5d（ステムの長さが5ヌクレオチド）、G15D6d（ステムの長さが6ヌクレオチド）、G15D7d（ステムの長さが7ヌクレオチド）の一本鎖コンフォメーション感受性ゲル電気泳動を使用したアプタマー・ビーコン候補の予備的評価で、これら核酸の各々は、複数のコンフォメーションで存在できることが明らかになった（図1.4；点線はゲル上のレーンが幾分曲がったことを示している）。G15D4dは、トロンビン不存在下では2つのコンフォメーションで存在したが、トロンビンを加えると単一の結合したコンフォメーションに完全に変換された。G15D5dは、トロンビン不存在下では4つのコンフォメーションで存在したが、G15D4dと類似のやり方で、トロンビンを加えると単一のコンフォメーションに完全に変換された。G15D6d及びG15D7dは、トロンビン不存在下では4つのコンフォメーションで存在したが、他の2つのアプタマーとは違って、トロンビンで一部分だけのアプタマーが結合できたに過ぎなかった。これら結果は、G15D4d及びG15D5dが、アプタマー・ビーコンを作成するための最も可能性のある候補であることを示唆した。これら2つの構造のうち、G15D5dがより良好な候補であると予測された。というのは、余分の塩基対が非結合性構造を安定化し、標的分子の不存在下でもたらされる信号がより低くなるだろうからである。

【0087】

図1.4は、ゲルの下半分においてフリーのアプタマーを示し、ゲルの上半分においてトロンビン：アプ

タマー・ビーコン複合体を示している。この図では、+はトロニン有りを示し、-はトロニン無しを示している。

トロニン結合へのステムの長さの影響も、競合結合性アッセイを使用することによって試験された。異なるステムの長さを有する4つのアプタマーが、元来のG15Dアプタマーと一緒に、放射標識されたG15D5dとの競合アッセイによる結合性について試験された(図15)。このグラフに示されるように、G15D4d、5d及び6dは全て類似の追出し曲線を有したが、G15D7dは結合性の低下を示した。

【0088】

アプタマー・ビーコンG15D4d、G15D5d及びG15D6dは、5'末端にフルオレセインを付加させて3'末端にDABCYL基を付加させることによって標識された。これらアプタマー・ビーコンG15D4dMB、G15D5dMB及びG15D6dMBは、TBB又はTE緩衝液のいずれかにおけるトロニン濃度の変動(0~120nM)に対するそれらの応答について評価された。各々のアプタマー・ビーコンのベースライン蛍光強度が、40nMアプタマー・ビーコンで、トロニンの不存下、日立蛍光分光光度計F-2500を使用して、495nm(励起及び発光について10nmのバンド幅)の励起波長で測定された。トロニン(100nM)の添加での平均蛍光強度変化を、各々のアプタマー・ビーコンのベースライン強度との比較で示す。表1において、NCは変化がなかったことを示す。

【0089】

【表1】

アプタマー	TBB	TBB + トロニン	TE	TE + トロニン
G15D4dMB	30	1.5	98	NC
G15D5dMB	7.5	NC	19	2.3
G15D6dMB	17	NC	20	1.7
G15D5ndMB	188	0.5	1102	0.7
G15D5dF	280	NC	380	NC

【0090】

表1は、G15D5dMB及びG15D6dMBがTEにおいて2つの最良のアプタマー・ビーコンであり、G15D4dMBがTBBにおいて最良であることを示している。G15D4dMBがTBB中でトロニンと結合して蛍光強度を増すことができたとき、G15D5dMB及びG15D6dMBは

できなかった。しかし、G15D4dMBがTE中でトロンピンと結合しなかったが、G15D5dMB及びG15D6dMBはトロンピンと相互作用できた。G15D4dMBにおけるような4つの塩基対二重体はTE中で不安定過ぎるのに対し、G15D5dMB及びG15D6dMBにおけるような5つ又は6つの塩基対二重体はTBB中で安定過ぎて、トロンピン結合に要求されるコンフォメーション変化が可能になるのであろう。このことは、TBB中でG15D4dMBがG15D5dMB及びG15D6dMBよりも2～3倍高い発光量を有することと一致しており、二重体コンフォメーションが少ないことを示唆している。TE中ではG15D4dMB及びG15D5dMBのベースラインがTBB中のベースラインよりも5～10倍高いが、これは、その緩衝液中に2価カチオンが欠如していることに起因してステムループ構造集団が減っていることを示唆している。

【0091】

次に、トロンピン結合用緩衝液中でのアプタマー・ビーコンの蛍光の変化が測定された。図1.6に示すように、G15D4dMBは、トロンピンの不存在下で穏やかな発光を有した。トロンピン濃度が増加するにつれて蛍光強度も増加するが、試験した濃度範囲（250 nM）内では飽和に達しなかった。トロンピンを添加したときの発光変化は、その平衡値に達するのに約2分要した。G15D5dMB及びG15D6dMBの両方は、トロンピンの不存在下では非常に低い蛍光発光しか有さず、その蛍光強度は、トロンピン濃度が増加しても変化しなかった。

【0092】

ゲル電気泳動測定（図1.4）は低塩緩衝液（TBE）中で行なわれたので、次に、TE緩衝液中でのアプタマー・ビーコン蛍光の変化を測定した。これら結果を図1.7に示す。TE緩衝液中では、G15D4dMBは、トロンピンの不存在下でずっと高い発光を有した。（図1.7に示された蛍光強度値は、表1にリストした値に相関させたものである。）G15D4dMBの蛍光発光は、トロンピンの添加では増加しなかった。G15D5dMBは、トロンピンの不存在下で比較的低い発光を有したが、トロンピンの添加と共に増加した。そのKdは、 3 ± 1 nMと見積もられた。蛍光強度の変化は、トロンピンの添加で即座に起こった。G15D6dMBアプタマー・ビーコンの蛍光発光も、トロンピンの添加で増加したが、より低い発光強度で飽和した。見積もられたKd（12 nM）はG15D5dMBよりも僅かに高かった。G15D5dMBについて見積もられたKdは、1.4～100 nMで変動するG15Dについて報告されたKdと類似している。異なるヌクレオチド及びプローブの付加（蛍光体及び消光体）がトロンピンへの結合性を弱めている可能性がある。フィルター結合競合アッセイは、G15D5

dMBについての親和性がTE中でG15D5dに比べて約6倍増加したことを示した。

【0093】

アプタマー・ビーコン・トロニン結合は、単に、蛍光体の化学的環境の変化を起こしているだけであるという可能性を調べるために、5'フルオレセイン標識を有するが3'DABCYL消光体を有さないアプタマーを作成した。このアプタマー、G15D5dFは、TBB又はTEのいずれの緩衝液中でも、トロニンの添加で蛍光強度の変化を本質的に示さなかった(図18)。

このアプタマー・ビーコンメカニズムは、同じアプタマー・ビーコンが標準分子ビーコンとして使用されたなら検出されるであろう変化に類似する蛍光発光の変化をもたらす筈である。この仮説を試験するために、G15D5dMBに相補的であるオリゴヌクレオチド(G15D5rev)を合成した。分子ビーコンとして使用されたときのそのアプタマー・ビーコンの蛍光強度の濃度依存的増加を図19に示す。

【0094】

最後の例として、もはやステム・ループ構造を形成できないG15D5dMBの修飾版が作成された。このアプタマー、G15D5ndMBでは、5'末端が配列TTTTTからなる。図13A~Dを参照すると、このアプタマーを含有する溶液へのトロニンの添加が、今度は、構造A、B及びCの間の平衡を変化させて、追加のトロニンが平衡状態を構造Aの方に進める筈である。まず、TBB中でこの試験を行なうと、トロニン結合性コンフォメーションが安定化するようにした。図20に示すように、トロニンの添加は、このアプタマーの蛍光発光を減少させなかった(これは異なるアプタマーなので、元のアプタマーに比した強度は必ずしも有意ではないことに留意のこと。)その半最大効果濃度は約80nMであった。この試験をTE緩衝液中で行うと(データは示されていない)、トロニンなしでの蛍光がTBB中におけるものの約5倍となり、そしてトロニンの添加に伴って減少した。TBB測定と違って、試験した濃度範囲内で飽和しなかった。

【0095】

G15D5dMBの結合特異性を確認するために、トロニンと同じ血漿セリンプロテアーゼであり、かつ触媒ドメインにおいて37%の配列同一性を有するファクターIXを使用した。図21に示すように、ファクターIXは、G15D5dMBの蛍光に影響を及ぼさなかった。ファクターIXがトロニンに密接に関連しているとはいえ、本発明の新規なアプタマー・ビーコンは、トロニンについて非常に特異的なので、いかなる正荷電タンパク質にもちつとも結合しないことを示している。

【0096】

TBB及びTE緩衝液中でアプタマー・ビーコン蛍光の間に差が観察されたので、トロンピン不存在下でのG15D5dMBの蛍光へのカチオン濃度の影響を検査した。このアプタマーは、20mMトリス-HCl緩衝液(pH7.5)中で10 μ Mとして調製され、そして、40nMのG15D5dMBの発光が、MgCl₂濃度を増加させながら(0~2.5mM)測定された。MgCl₂の滴定で、50 μ Mの半最大効果濃度を示した(図2.2)。カチオンによる発光の減少は、ステムループ構造への安定化効果のためのようである。以前、KClは、トロンピン抑制においてG15DのKiを低下させると報告されたが、G15D誘導体では報告されていない。本発明者らは、5mMのKClは、G15D4dMBの蛍光強度にいかなる有意な影響も及ぼさないことを見出した。高濃度の1価カチオン(140mMNaCl)及び1mMの2価カチオン(Mg²⁺及びCa²⁺)も蛍光を低下させた。

これら結果は、G15D5dMBが、潜在的アプタマー・ビーコン候補の初期一本鎖コンフォメーション感受性ゲル電気泳動アッセイから確認されたように、実際に好ましいアプタマー・ビーコンであったことを証明した。これら結果は、本生物工学処理アプタマーがアプタマー・ビーコンメカニズムを介して信号を提供することも証明した。

【0097】

他の態様 詳細な説明に関連させて本発明を説明してきたが、上記の説明が例示のために意図されたものであって、請求の範囲により規定される本発明の範囲を限定することを意図していないことが理解されるであろう。他の側面、効果、及び変更は、請求の範囲を逸脱するものではない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A及び図1Bは、アプタマー・ビーコンをガラスに付ける方法を示す概略図である。

【図2】

図2は、図1に示した方法を用いてガラスに付けられることができるアプタマー・ビーコン構造を示すものである。

【図3】

図3A~3Dは、アプタマー・ビーコンへの標的分子の結合の信号を発するための蛍光をベースとする2種類のリポーター系を示す概略図である。

【図4】

図4A~4Dは、アプタマー・ビーコンへの標的分子の結合の信号を発するのための別の蛍光をベースとする2種類のリポーター系を示す概略図である。

【図5】

図5は、内部全反射境界における極微波励起を示す概略図である。

【図6】

図6は、アプタマー・ビーコンに結合した標的分子の存在を検出するための検出系の概略図である。

【図7】

図7は、図6の検出系のプリズム及びカバースリップの概略図である。

【図8】

図8は、アプタマー・ビーコンに結合した標的分子の存在を検出するための別の検出系の概略図である。

【図9】

図9Aは、標的分子上の異なる結合部位に結合するように配置された2種の異なる核酸を用いる2部分アプタマー・ビーコン検出戦略を示す概略図である。

図9Bは、標的分子上の異なる結合部位に結合するように配置された2種の異なる核酸を用いる別の2部分アプタマー・ビーコン検出戦略を示す概略図である。

【図10】

図10Aは、アプタマー・ビーコンアレイの概略図である。

図10Bは、図9Aのアプタマー・ビーコンアレイにおいてサンプルにそのアレイを曝した後に蛍光を示す像の概略図である。

【図11】

図11A及び11Bは、検出系のアウトプットにおけるパターンを検出するためのプロセスのフローチャートである。

【図12】

図12は、溶液をベースとする検出方法で使用するための検出系を示す概略図である。

【図13】

図13A～13Dは、種々のコンフォメーションのトロンピンアプタマー・ビーコンの一連の概略図である。

【図14】

図14は、トロンピンを有する種々のアプタマー・ビーコン及びトロンピンを有さない種々のアプタマー・ビーコンを示す電気泳動ゲルを示すものである。

【図15】

図15は、放射性標識されたアプタマー・ビーコン（G15D5d）の未標識アプタマー・ビーコンでの追出しを示すグラフである。

【図16】

図16は、トロンビン結合性緩衝液（TBB）中でのアプタマー・ビーコンG15D4dMBの蛍光強度をトロンビン濃度の関数として示すグラフである。

【図17】

図17は、TE緩衝液中での種々のアプタマー・ビーコンの蛍光発光をトロンビン濃度の関数として示すグラフである。

【図18】

図18は、TE及びTBB緩衝液中でのアプタマー・ビーコンG15D5dSPの蛍光発光をトロンビン濃度の関数として示すグラフである。

【図19】

図19は、TE緩衝液中でのアプタマー・ビーコンG15D5dMBの蛍光発光を相補的オリゴヌクレオチドG15D5rev（アンチセンス鎖）の濃度の関数として示すグラフである。

【図20】

図20は、TBB緩衝液中でのアプタマー・ビーコンG15D5ndMBの蛍光発光をトロンビン濃度の関数として示すグラフである。

【図21】

図21は、TE緩衝液中でのアプタマー・ビーコンG15D5dMBの蛍光へのトロンビン及びファクターIXの効果を示すグラフである。

【図22】

図22は、TE緩衝液中でのアプタマー・ビーコンG15D5dMBの蛍光へのマグネシウム濃度の効果を示すグラフである。

の種々の一連の概略図である。

図面

【図1】

图 3 A

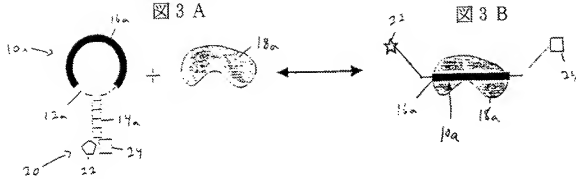


图 3 B

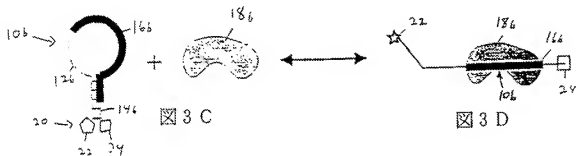


图 3 C

图 3 D

图 4

图 4 A

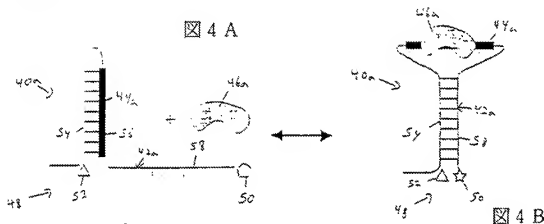


图 4 B

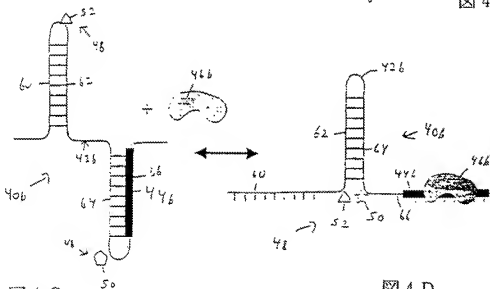
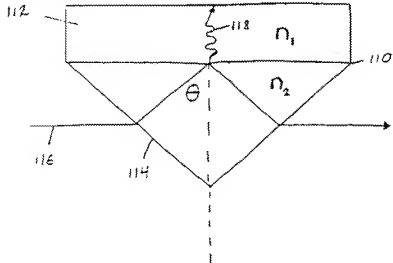


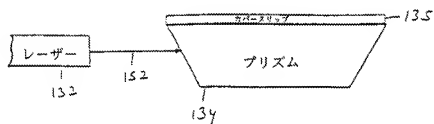
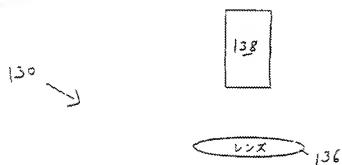
图 4 C

图 4 D

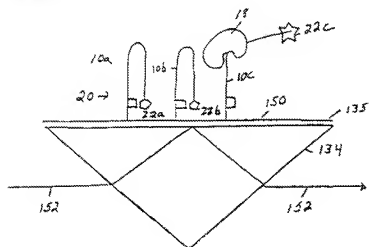
图 5



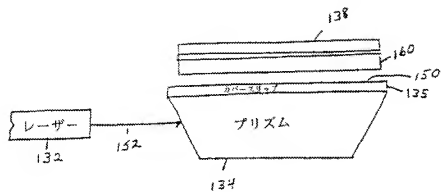
【図6】



【図7】



【図8】



【図9】

図9 A

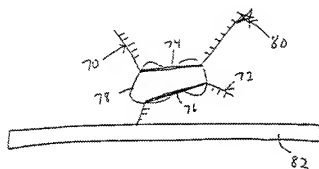
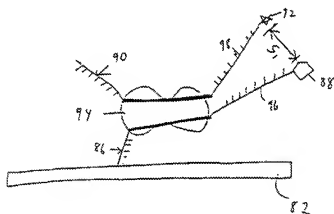
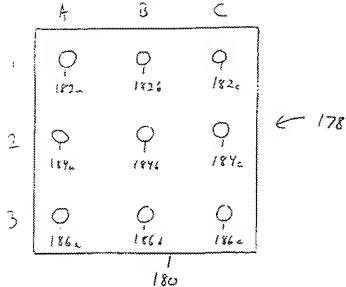


図9 B

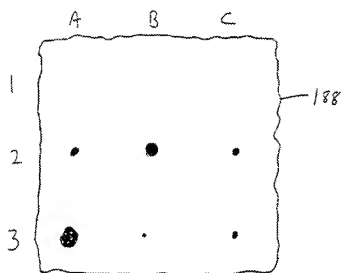


【図10】

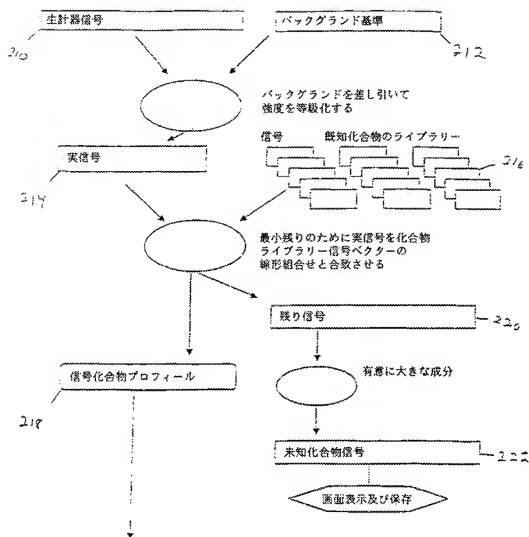
☒ 10 A



☒ 10 B



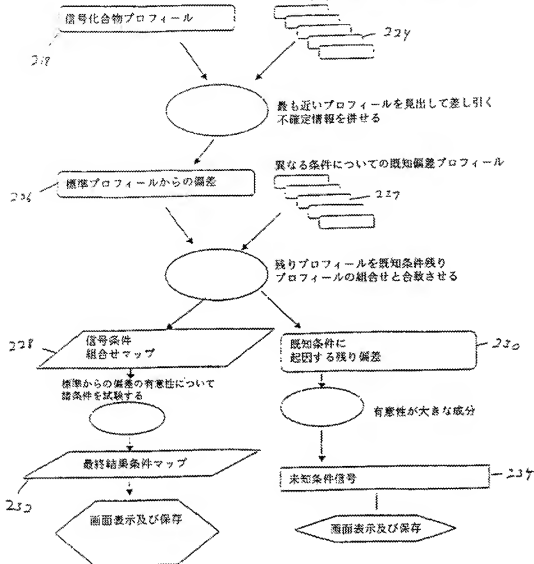
☒ 11 A



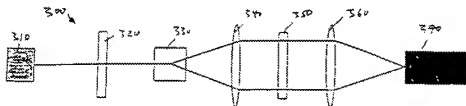
【図11B】

第2任務 信号プロフィールからの
諸プロフィールの同定

サンプル情況について選択された
標準プロフィールのライブラリー



【図1.2】



【図1.3】

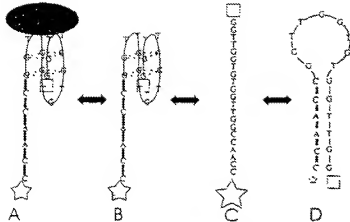
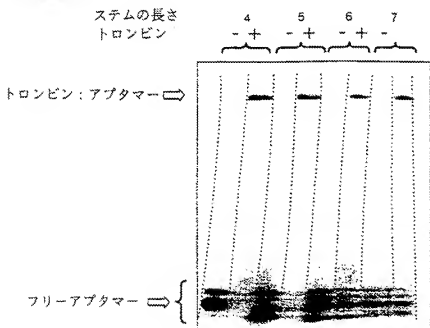


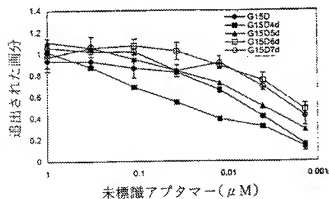
図13 A 図13 B 図13 C 図13 D

【図14】



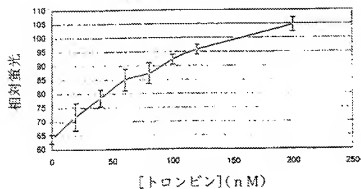
【図15】

標識G15D5dの追出し性



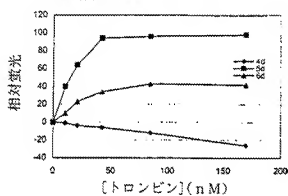
【図16】

TBB緩衝液中のG15D4dMB

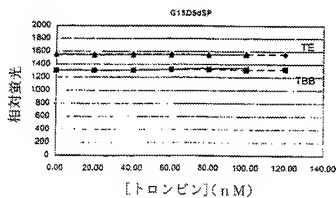


【図17】

TE緩衝液中のアプタマー・ビーコン

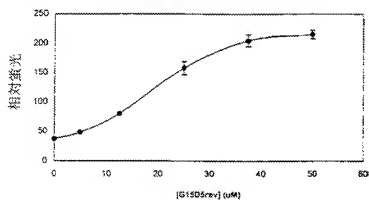


【図18】



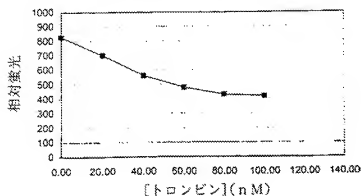
【図19】

TE緩衝液中のG15D5dMB



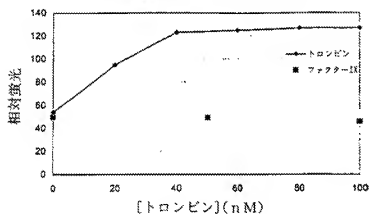
【図20】

TBB中のG15D5ndMB



【図21】

TE緩衝液中のG15D5dMB



【図22】

TE中のG15D5dMB

